

HERSTELLUNG EINES SPEZIFISCHEN
XENOGENEN ANTIMACROPHAGENSERUMS,
SEINE IN VITRO/IN VIVO AUSTESTUNG
UND SEINE WIRKUNG IN EINEM XENOGENEN
HAUTTRANSPLANTATIONSMODELL

Rudolf Sebald

1976



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
Direktor: Prof. Dr. W. Brendel

HERSTELLUNG EINES SPEZIFISCHEN XENOGENEN ANTIMACROPHAGENSERUMS,
SEINE IN VITRO/IN VIVO AUSTESTUNG UND
SEINE WIRKUNG IN EINEM XENOGENEN HAUTTRANSPLANTATIONSMODELL



Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt von
Rudolf Sebald
aus Memmingen

1976



Mit Genehmigung des Fachbereichs Medizin
der Universität München

Berichterstatter:

Prof. Dr. W. Brendel

Dekan:

Prof. Dr. W. Spann

Tag der mündlichen Prüfung:

18. 5. 1976

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

1.	Einleitung	1
2.	Aufgabenstellung	2
3.	Methodik	3
4.	Ergebnisse	4
5.	Schlussfolgerungen	5
6.	Literaturverzeichnis	6
7.	Anhang	7
8.	Bibliographie	8
9.	Index	9
10.	Abkürzungen	10
11.	Formularien	11
12.	Diagramme	12
13.	Tabelle	13
14.	Abbildung	14
15.	Formel	15
16.	Skizze	16
17.	Plan	17
18.	Diagramm	18
19.	Tabelle	19
20.	Abbildung	20
21.	Formel	21
22.	Skizze	22
23.	Plan	23
24.	Diagramm	24
25.	Tabelle	25
26.	Abbildung	26
27.	Formel	27
28.	Skizze	28
29.	Plan	29
30.	Diagramm	30
31.	Tabelle	31
32.	Abbildung	32
33.	Formel	33
34.	Skizze	34
35.	Plan	35
36.	Diagramm	36
37.	Tabelle	37
38.	Abbildung	38
39.	Formel	39
40.	Skizze	40
41.	Plan	41
42.	Diagramm	42
43.	Tabelle	43
44.	Abbildung	44
45.	Formel	45
46.	Skizze	46
47.	Plan	47
48.	Diagramm	48
49.	Tabelle	49
50.	Abbildung	50
51.	Formel	51
52.	Skizze	52
53.	Plan	53
54.	Diagramm	54
55.	Tabelle	55
56.	Abbildung	56
57.	Formel	57
58.	Skizze	58
59.	Plan	59
60.	Diagramm	60
61.	Tabelle	61
62.	Abbildung	62
63.	Formel	63
64.	Skizze	64
65.	Plan	65
66.	Diagramm	66
67.	Tabelle	67
68.	Abbildung	68
69.	Formel	69
70.	Skizze	70
71.	Plan	71
72.	Diagramm	72
73.	Tabelle	73
74.	Abbildung	74
75.	Formel	75
76.	Skizze	76
77.	Plan	77
78.	Diagramm	78
79.	Tabelle	79
80.	Abbildung	80
81.	Formel	81
82.	Skizze	82
83.	Plan	83
84.	Diagramm	84
85.	Tabelle	85
86.	Abbildung	86
87.	Formel	87
88.	Skizze	88
89.	Plan	89
90.	Diagramm	90
91.	Tabelle	91
92.	Abbildung	92
93.	Formel	93
94.	Skizze	94
95.	Plan	95
96.	Diagramm	96
97.	Tabelle	97
98.	Abbildung	98
99.	Formel	99
100.	Skizze	100

Der Person, die mir zur Fertigstellung dieser Arbeit geholfen hat.

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Einleitung	4
3. Abkürzungen	6
4. Arbeitsplan	7
5. Material und Methoden	9
5.1. Versuchstiere	9
5.2. Präparation der Zellen	9
5.2.1. Isolierung und Inkubation der Makrophagen	9
5.2.2. Präparation der Lymphozyten für Serum, Absorption und Test	11
5.2.3. Erythrozyten	12
5.3. Herstellung der Seren an Kaninchen	13
5.3.1. Antimakrophagenserum	13
5.3.2. Antilymphozytenserum	13
5.3.3. Normalkaninchenserum	14
5.4. Weiterbehandlung der Seren durch Absorption	14
5.4.1. Absorption von ALS, AMS und NKS mit Erythrozyten	14
5.4.2. Absorption von ALS ₁ und AMS ₁ mit LZ	14
5.5. Verwendung der Seren bei xenogener Haut- transplantation	14
5.5.1. Methodik der Hauttransplantation	14
5.5.2. Beurteilung der Transplantatsabstoßung	15
5.5.3. Dosierung der Serumbehandlung	15
5.6. Austestung der Seren	16
5.6.1. Zytotoxischer Test der Seren mit MP und LZ	16
5.6.2. Agglutinationsteste der Seren mit MP und Erythrozyten	17
5.6.3. Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony	17
5.6.4. Komplementbindungsreaktion	18
5.6.5. In vivo - Phagozytosestest mit Tusche	19
5.6.6. In vitro - Phagozytose von Human- erythrozyten	20
5.7. Materialien und Geräte	21
6. Ergebnisse	25

	Seite
6.1. Phagozytostests	25
6.1.1. Intraperitoneale Phagozytose von Tusche- partikeln nach i.p. Injektion von NKS ₁ bzw. AMS ₁ bei Ratten	25
6.1.2. In vitro - Phagozytose von Humanerythro- zyten nach Inkubation von NKS ₁ , ALS ₁ bzw. AMS ₁ mit Peritonealmakrophagen von Ratten.	26
6.2. Serologische Untersuchungen der ver- schiedenen Testseren	28
6.2.1. Präzipitierende Antikörper der hergestell- ten Kaninchenserum gegen Antigene in Rat- tenserum und Rattengewebe	28
6.2.2. Komplementbindende Antikörper der herge- stellten Kaninchenserum gegen Antigene aus Rattengewebe	29
6.2.3. Zytotoxische und agglutinierende Wirkung der Testseren auf Erythrozyten, Lympho- zyten und Makrophagen von Ratten	30
6.3. Wirkung der Seren auf die Überlebenszeit xenogener Hauttransplantate	33
6.3.1. Kontrollstudien mit unbehandelten Ratten und nach Behandlung mit NKS und NKS ₁	33
6.3.2. Behandlung der Empfängertiere mit AMS ₁ , ALS ₁ (= AMS ₂ , ALS ₂)	35
6.3.3. Gegenüberstellung der Transplantatsüber- lebenszeiten bei Behandlung der Empfän- gertiere mit AMS ₂ , ALS ₂ und NKS ₁	36
6.3.4. Wirkung eines AMS auf das Überleben xeno- gener Hauttransplantate, das mit Freund- schem Adjuvans hergestellt und mit Ratten- erythrozyten absorbiert wurde	38
6.4. Serologische Aktivität im Vergleich mit der Wirkung der Seren auf das Überleben xeno- gener Hauttransplantate	39
7. Diskussion	42
7.1. Allgemeiner Teil	42
7.1.1. Die Zelle "Makrophage"	42
7.1.2. Der Makrophage im Immunsystem	43
7.1.3. Zelluläre immunologische Versuchsmodelle mit MP	44
7.1.4. Ontogenese der MP und Herstellung eines AMS	44
7.2. Zur Herstellung eines AMS	46

	Seite
7.3. Zur Spezifität eines AMS	48
7.4. Problematik der serologischen Tests	51
7.5. Beurteilung der Phagozytostests	51
7.6. AMS in einem xenogenem Hauttransplan- tationsmodell	53
7.6.1. Immunologische Beteiligung der MP bei der Abstoßung von Gewebe	53
7.6.2. Antikörperwirkung der hergestellten Seren in vivo	54
7.6.3. Zur optimalen Immunsuppression durch ein potentes AMS im xenogenen Hauttransplan- tationsmodell	56
8. Zusammenfassung	58
9. Literaturverzeichnis	59

2. Einleitung

=====

Analog zur Herstellung eines Antilymphozytenserums (ALS), dessen Wirkungsweise ausführlich beschrieben wurde (1,30, 31,39,40,45,51,59-62,69), sollte ein Antimakrophagenserum (AMS) präpariert werden. Gilt die immunsuppressive Wirkung eines ALS als gesichert, so ist dies bei einem AMS noch weiter nachzuprüfen.

Wohl sind Hypothesen und Theorien über die Rolle der Makrophagen (MP) im Ablauf der Immunantwort veröffentlicht. Sowohl im afferenten wie im efferenten Schenkel der Immunreaktion sollen sie eingreifen.

Es wird diskutiert, daß phagozytierte Antigene in MP weiterverarbeitet, dadurch immunogener werden (9), daß durch MP-Antigenkontakt eine spezifische MP - RNS gebildet wird, die den Anstoß für die Produktion spezifischer Antikörper in den Lymphozyten (LZ) gibt (21,23,29). Weiter wird die Frage untersucht - vor allem bei partikulären Antigenen -, ob MP unabdingbare oder nur partiell beteiligte Mittlerzellen bei der Antigenstimulation der LZ zur Antikörperbildung sind (23).

In der efferenten Phase der Immunantwort sollen sie direkt mit den Oberflächenantigenen der Zielzellen interagieren, dadurch zytotoxisch wirken und die Zelltrümmer abtransportieren (24,47,58).

Ein Antiserum gegen Makrophagen konnte also zu einem ergänzenden immunsuppressiven Prinzip führen. In jüngster Zeit wurden xenogene Antimakrophagenseren (AMS) von verschiedenen Arbeitsgruppen hergestellt (8,18,19,33,41-43,46,48,57,67, 70,74).

In diesen Untersuchungen zeigt sich, daß ein AMS Peritonealmakrophagen agglutinieren kann, bei ihnen Kerndegenerationen bewirkt, sie lysiert, weiterhin, daß ein AMS die Phagozytose in vitro und in vivo unterdrückt, die Antikörperproduktion hemmt und die Überlebenszeit von allogenen Transplantaten

verlängert. Darüber hinaus wird beschrieben, daß ein AMS die Transformation durch spezifisches Antigen sensitivierter LZ zu Lymphoblasten hemmt. Weiterhin bewirkt ein AMS histologische Veränderungen im RHS des Lymphgewebes.

Im Rahmen dieser Thematik geht es in dieser Arbeit um die Herstellung und Testung eines spezifischen AMS, das insbesondere keine antilymphozytären Antikörper enthält. Die Testung seiner in vivo Wirkung am Modell xenogener Hauttransplantation bei Nagern wird näher beschrieben und diskutiert.

3. Abkürzungen =====

LZ	Lymphozyten
MP	Makrophagen
PZ	Peritonealzellen
ERY	Erythrozyten
SRBC	sheep red blood cells
NKS	Normalkaninchenserum
NKS ₁	Normalkaninchenserum mit Erythrozyten absorbiert
ALS ₁	Antilymphozytenserum " " "
ALS ₂	Antilymphozytenserum " " und Lymphozyten absorbiert
AMS ₁	Antimakrophagenserum " Erythrozyten absorbiert
AMS ₂	Antimakrophagenserum " " und Lymphozyten absorbiert
AMS _{3a}	Antimakrophagenserum mit Freundschem Adjuvans hergestellt, unabsorbiert
AMS _{3b}	Antimakrophagenserum mit Freundschem Adjuvans hergestellt, mit Erythrozyten absorbiert
mfA	mit Freundschem Adjuvans hergestellt
RS	Rattenserum
KBR	Komplementbindende Reaktion
H.L.	Hanksche Lösung
EDTA	Äthylendiaminteraesigsäure (engl. Abk.)
i.p.	intra peritoneum
Li Mi	Lichtmikroskop
x g	mal die Erdbeschleunigung ≠ g = Gramm
rpm	rounds per minute

4. Arbeitsplan =====

Das Vorgehen während der Untersuchung soll hier kurz vorweggenommen und begründet werden.

Eine immunologische Methode wurde zur Herstellung eines spezifischen Serums herangezogen. Dazu wurden Antikörper gegen Makrophagen von Ratten an Kaninchen erzeugt. Bei der Präparation des gegen Rattenmakrophagen gerichteten Serums lag das Schwergewicht auf der Gewinnung einer reinen Makrophagenzellfraktion, sowie auf der Prüfung des Serums, das außer gegen Rattenmakrophagen keine Antikörper gegen eine andere Zellfraktion haben sollte.

Bei der Präparation nicht von anderen Zellen verunreinigter Makrophagensuspensionen wurde die Wirkung eines Antilymphozytenserums gegen Rattenlymphozyten eingesetzt. Den Spenderatten der Makrophagen wurde in vivo ALS gespritzt, in vitro wurden die inkubierten MP mit ALS inkubiert. In vivo verringerte ALS die Lymphozyten im Spendertier, in vitro lysierte das ALS noch anwesende Lymphozyten.

Bei der Immunisierung der Kaninchen mit Rattenmakrophagen wurde ALS gegeben in der Absicht, so ein passives Enhancement zu erreichen.

Das so gewonnene AMS wurde durch Absorption mit Rattenerythrozyten und Rattenlymphozyten von noch vorhandenen störenden Antikörpern gereinigt. Durch zytotoxische und Agglutinationstests sollte die hergestellte Spezifität gegen MP nachgewiesen werden.

Im xenogenen Hauttransplantationsmodell (Kaninchenhaut auf Ratte) sollte das AMS im Vergleich mit anderen Seren weiter getestet werden. Eine mögliche Verlängerung der Überlebenszeit der xenogenen Hauttransplantate sollte kritisch gewertet werden.

Im xenogenen Modell wurde gearbeitet, um Vergleiche zu bekannten Ergebnissen mit ALS und zu allogenen Transplantationsmodellen anzustellen. Zudem wurde angenommen, daß ein

xenogenes Hauttransplantat immunogener im Empfängertier wirkt als ein allogenenes.

Nicht zuletzt dürften in der klinischen Anwendung xenogene Transplantate leichter zur Verfügung stehen.

5. Material und Methoden

5.1. Versuchstiere

Versuchstiere waren immer männliche Sprague-Dawley Ratten. Sie wogen 180-200 g, was etwa einem Alter von 12 Wochen entsprach. Alle Ratten stammten aus der gleichen Koloniezucht. Ein Teil dieser Ratten lieferte die Immunisierungsmakrophagen für die Herstellung der Seren und wurde nach Entnahme der Zellen nicht mehr verwendet. Die übrigen Spague-Dawley Ratten dienten als Empfänger der Kaninchenhauttransplantate.

Hergestellt wurden die Seren an mischrassigen Kaninchen beiderlei Geschlechts. Sie hatten ein durchschnittliches Gewicht von 4 kg. Nicht immunisierte Spenderkaninchen lieferten das Material für die Hauttransplantate.

Die Ratten bekamen ein käufliches Futter aus gepreßten Grasballen und Wasser ad libitum.

5.2. Präparation der Zellen

5.2.1. Isolierung und Inkubation der Makrophagen

Unter sterilen Bedingungen wurden jeder Ratte 5 ml einer wässrigen Lösung i.p. gespritzt. Nach einer Beschreibung von Fishman (20) enthielten 5 ml dieser Lösung 0,25 g beef-heart und 0,25 g proteose peptone. Gleichzeitig bekam die Ratte 1 ml ALS i.p., dessen Herstellung unter 5.3.2. beschrieben wird. Nach 48 Stunden wurden die in das cavum peritonei immigrierten Zellen unter sterilen Bedingungen aus der Bauchhöhle der entbluteten Ratte gewonnen. Das trübe Peritonealzellexudat wurde dreimal mit 10 ml Hankscher Lösung noch in der Peritonealhöhle verdünnt, vorsichtig durchmischt und mit einer Glasspritze abgesaugt. Die Hanksche Lösung enthielt pro 1 ml 10 Einheiten Heparin und 1 % Medium 199. Das Zellmaterial von 20 Ratten wurde gepoolt und zweimal mit Hankscher Lösung bei 50 xg 10 Minuten gewaschen.

Die Auszählung nach einem mit Wrightscher Schnellfärbung angefertigten Ausstrich ergab durchschnittlich folgende prozentuale Zellanteile:

Vorausgeschickt seien noch die lichtmikroskopischen Merkmale der „macrophage like cells“, die in dieser Arbeit als Makrophagen (MP) bezeichnet werden:

Polygonale Zellmembran, Zelldurchmesser 10-30 μ , Kerndurchmesser 6-12 μ , reichliches, leicht basophiles Zytoplasma, durchsetzt mit zahlreichen Vakuolen und Granula, exzentrischer ovaler oder nierenförmiger Kern, der sich heller als der Kern eines Lymphozyten anfärbt.

Ungefärbt fällt bei längerer Betrachtung die Neigung der Zellen zur Agglutination und ihre amöboide Beweglichkeit auf.

55 - 60 % MP

25 - 30 % kleine LZ

10 - 12 % Granulozyten

3 % Mastzellen

Zelltrümmer

Das gewaschene Zellmaterial wurde in 15 ml Hankscher Lösung resuspendiert. Je 2 ml der gewaschenen Peritonealzellsuspension mit 10^8 Zellen wurden mit 2 ml ALS₁, 1 ml Medium 199 und 0,5 ml Meerschweinchenkomplement für 90' bei 37°C in einem Wasserbad regulierbarer Schüttelfrequenz inkubiert.

In den sich anschließenden 2-3 Waschvorgängen wurden die Zellen wieder in Hankscher Lösung resuspendiert und bei 50 xg für je 10' zentrifugiert. Ganze Zellen blieben im Sediment, Überreste von beefheart, proteose peptone und lytische Zellbestandteile reicherten sich größtenteils im Überstand an und konnten jeweils dekantiert werden.

Ausstriche von solchen sedimentierten gewaschenen Zellen, die das endgültige Zellmaterial für das AMS abgaben, enthiel-

ten durchschnittlich:

85 - 90 % MP

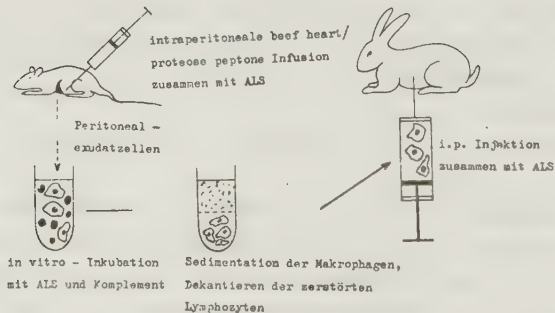
10 % Granulozyten

5 % LZ mit zytoplasmatischen Vakuolen und Membranrissen

Vereinzelte Mastzellen und nicht identifizierbare Zellrückstände

Die Oberflächenmembran der MP wurde im LiMi untersucht. Die Phagozytosefähigkeit wurde im Vitaltest mit blauer Tusche beobachtet.

Schema zu 5.2.1. - 5.3.1.



5.2.2. Präparation der Lymphozyten für Serum, Absorption und Test

Die LZ für die Immunisierung der Kaninchen wurde durch Drainage des ductus thoracicus von Sprague-Dawley Ratten gewonnen wie bereits bei Land et alii (40) beschrieben.

Für die Absorption von Seren wurde eine Zellsuspension von LZ hergestellt, die aus Lymphknoten und Thymus von Sprague-

Dawley Ratten präpariert war. Thymus und Lymphknoten wurden aus dem Mediastinum bzw. Mesenterium herausgelöst und von Fett, Gefäßen und Kapsel freipräpariert. Dieses Rohmaterial wurde in 0,9 %igem NaCl mit der Schere weiter zerkleinert, durch ein Teesieb gepreßt und anschließend vorsichtig mit dem Potterschen Apparat bearbeitet. Auf sterile Arbeitsbedingungen wurde streng geachtet.

Unter dem LiMi konnte aus dem angefärbten Ausstrich des so erhaltenen Zellmaterials vor allem Einzelzellen, Zellhaufen und Zelltrümmer von LZ unterschieden werden. Durch zweimaliges Waschen in Hankscher Lösung konnte reichlich an der Oberfläche schwimmendes Fett von der gewünschten Zellsuspension getrennt werden.

Der lymphozytotoxische Test wurde mit LZ aus frisch defibriertem Blut gemacht, einer Methode nach Walford, Gallagher und Troup (76).

In einer Dextrasedimentation setzten sich dabei zuerst die Erythrozyten ab. Darauf konnten die Leukozyten als Gesamtfraktion abgehoben werden. Aus dieser Fraktion wurden Mikro- und Makrophagen durch Inkubation in Terrylen entfernt. Abschließend konnten aus der Restfraktion durch eine Albuminflotation reine LZ isoliert werden. Zweimal in Hankscher Lösung gewaschen und in autologem Serum suspendiert, wurden sie im Test verwendet.

5.2.3. Erythrozyten

Sprague-Dawley Ratten wurden mit 2 ml 3,6%igem Chloralhydrat narkotisiert, die Aorta abdominalis freipräpariert, punktiert und das arterielle Blut in eine 10 ml Spritze mit 1 ml EDTA aufgezogen.

Für Test und Absorption wurden die Erythrozyten in Hankscher Lösung gewaschen.

Für den Hämagglutinationstest wurden die Zellen in gepuffertem 0,9 %igen NaCl suspendiert und zwar 0,1 ml Erythrozytenmasse in 49,9 ml NaCl.

5.3. Herstellung der Seren an Kaninchen

5.3.1. Antimakrophagenserum (hergestellt mit und ohne Freundschem Adjuvans)

Bei der Immunisierung ohne Freundsches Adjuvans erhielt jedes Kaninchen i.p. 6 Injektionen, die gleichmäßig über 3 Wochen verteilt waren. Pro Injektion und Kaninchen kamen etwa 10^8 Zellen, die gemeinsam mit 1 g Paraxin in 5 ml physiologischer Kochsalzlösung suspendiert waren. 6 Tage nach der letzten Injektion wurden die Kaninchen entblutet, das abzentrifugierte Serum gepoolt, eine halbe Stunde bei 56°C hitzeinaktiviert und dann bei -20°C bis zum Gebrauch gelagert.

Ein Immunisierungsversuch mit Freundschem Adjuvans wurde bei 5 randomisierten Kaninchen unternommen. Diese bekamen nur zweimal, am 1. und 7. Tag eine Injektion. Eine Injektionsmenge enthielt etwa 3×10^8 Zellen, in 4 ml Hankscher Lösung suspendiert. Dazu wurde 1 ml komplettes Freundsches Adjuvans als Wasser in Ölemulsion gegeben und sorgfältig gemischt. Jeweils 2,5 ml wurden tief i.m. in die beiden glutei maximi eines jeden Kaninchens injiziert. Gleichzeitig mit den Injektionen wurde i.p. 1 g Paraxin, zusammen mit der 1. Dosis in eine Ohrvene noch 3 ml ALS_1 gespritzt. 6 Tage nach der 2. Injektion wurden die Tiere entblutet, das abzentrifugierte Serum gepoolt, hitzeinaktiviert und bei -20°C eingefroren.

5.3.2. Antilymphozytenserum

Die ductus thoracicus LZ drainierter Sprague-Dawley Ratten wurden den Kaninchen 6mal in gleichen Zeitabständen über 3 Wochen verteilt i.p. gespritzt. Jede Injektionsmenge enthielt etwa 1-5mal 10^8 LZ. 6 Tage nach der letzten Injektion wurden die Tiere entblutet, das abzentrifugierte Serum gepoolt, hitzeinaktiviert und bei -20°C gelagert.

5.3.3. Normalkaninchenserum

Das Normalkaninchenserum (NKS) wurde durch Entbluten unbehandelter randomisierter Kaninchen hergestellt. Die abzentrifugierten Seren wurden gepoolt, bei 56°C hitzeinaktiviert und bei -20°C eingefroren.

5.4. Weiterbehandlung der Seren durch Absorption

5.4.1. Absorption von ALS, AMS und NKS mit Erythrozyten

Die gewaschenen Rattenerythrozyten wurden mit den zu absorbierenden Seren im Volumenverhältnis 1:1 120' bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Die Absorption wurde gegebenenfalls wiederholt.

5.4.2. Absorption von ALS₁ und AMS₁ mit LZ ----- (Zellpräparation s. 5.2.2.)

Das gewaschene Absorptionsmaterial wurde mit den zu absorbierenden Seren 12 Std. bei 37°C in einem Schüttelwasserbad inkubiert. Das Volumenverhältnis Serum/Zellmaterial verhielt sich 2/1. Anschließend wurden die Seren bei 17500 xg 20' zentrifugiert. Zentrifugiert wurde so oft, bis in den Seren nur eine sehr geringe Trübung festzustellen war.

5.5. Verwendung der Seren bei xenogener Hauttransplantation

5.5.1. Methodik der Hauttransplantation

Bei allen Versuchen waren die Empfänger Sprague-Dawley Ratten. Die transplantierte Haut stammte von Kaninchenohren. Diese Ohrenhaut ist nahezu frei von subcutanem Fettgewebe und nur wenig mit Gefäßen versorgt. Mit einer Stanzzange wurden aus den präparierten Kaninchenohrenhautlappen etwa pfennig-

große Rundtransplantate herausgeschnitten und bis zur Transplantation in eisgekühltem 0,9 %igem NaCl aufbewahrt.

Die Ratten wurden mit je 2 ml 3,6 %igem Chloralhydrat i.p. narkotisiert. Dann wurde ihnen der Rücken rasiert und mit Pilca restliche Haare entfernt. Aus dem Rücken der Ratte wurden beiderseits der Wirbelsäule 2 pfenniggroße Rundlöcher gestanzt bis in die Subcutis. Eines der herausgestanzten Hautstücke wurde von Subcutis freipräpariert und zur Kontrolle als Autotransplantat auf der Herzseite reimplantiert. Auf die andere, künstlich gesetzte Wundfläche kam eines der aufbereiteten Kaninchenohrenhauttransplantate. Die Hauttransplantate wurden mit Histoacrylkleber fixiert. Abgedeckt wurden die operierten Hautstellen mit rostfreien Stahlgittern, die mit Leukoplast unverrückbar an der Ratte befestigt waren.

Zu betonen ist, daß pro Versuchsserie die Hauttransplantate von jeweils nur 1 Kaninchen verwendet wurden.

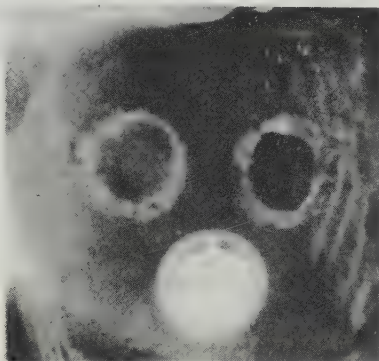
5.5.2. Beurteilung der Transplantatsabstoßung

Die Ratten waren in Einzelkäfigen untergebracht und wurden vom 7. Tag an, ab dem erfahrungsgemäß erste Abstoßungszeichen auftraten, täglich kontrolliert. Die Prüfung erfolgte visuell und durch Berühren. Als abgestoßen galt ein Transplantat, wenn es zu weniger als 10 % der Transplantatsfläche lebensfähig war. Lebensfähig wurde ein Transplantat bezeichnet, das weich war, an der Stelle haftete und sich, wenn man es zusammenschob, augenblicklich und von selbst zurückstellte.

5.5.3. Dosierung der Serumbehandlung

Die Transplantatempfänger bekamen bei allen Experimenten die gleiche Serumbehandlung, nämlich am 1., 3. und 5. Tag nach der Transplantation 2 ml des jeweiligen Serums i.p..

Versuchsratte mit Autotransplantat links und
Xenotransplantat rechts



5.6. Austestung der Seren

5.6.1. Zytotoxischer Test der Seren mit MP und LZ

Die für den Test präparierten MP und LZ wurden mit 0,9 %igem NaCl in einer geometrischen Verdünnungsreihe angesetzt einschließlich Leerprobe. Die Endverdünnung des zu testenden Antiserums zum unverdünnten Ausgangsantiserum entsprach bei einem Verhältnis 1024:1 einer Serie von 12 Röhrchen. Die Reaktionsmischung in jedem Röhrchen dieses Tests bestand aus 0,1 ml Antiserum der jeweiligen Verdünnungsstufe, 0,1 ml Zellsuspension - 100-500 Zellen in hetero- bzw. autologem Serum entsprechend - und 0,1 ml gelöstem Meerschweinchenkomplement. Nach 90' bei 37°C Inkubation wurde Trypanblau zugegeben und die Testmischung auf Objektgläser übertragen. Die Ergebnisse wurden nach Zugabe des Farbstoffes ohne Verzögerung unter dem LiMi abgelesen. Der Prozentsatz gefärbter MP bzw. LZ wurde bestimmt. Als zytotoxisch positiver Effekt galt, wenn über 20 % der Zellen angefärbt waren.

5.6.2. Agglutinationstests der Seren mit MP und Erythrozyten

Für den MP-Agglutinationstest wurden die MP wie angegeben präpariert und in autologem inaktivierten Serum suspendiert. Die geometrische Verdünnungsreihe wurde mit dem zu testendem AMS angesetzt, diesmal allerdings ohne Meerschweinchenkomplement. Nach 90' Inkubation bei 37°C wurden die Zellen auf Objektträgern ausgegossen und unter dem LiMi beurteilt. Agglutinierende Wirkung wurde bis zu der Serumverdünnung angenommen, bei der die Konzentration der Agglutination nicht mehr abnahm, d.h. der Leerprobe mit NaCl entsprach. Zugleich wurden im gleichen Test Schnellfärbungen nach Wright angefertigt. Die Agglutination konnte dadurch besser beurteilt werden. Auch hier galt die Serumverdünnung als Endtiter, die der spontanen MP-Agglutination der Kontrolle mit NaCl entsprach.

Beim Hämagglutinationstest wurden die für den Test präparierten Erythrozyten mit den zu testenden Seren in einer Verdünnungsreihe angesetzt. Jeweils gleiche Volumina (0,1 ml) der Rattenerthrozyten und der Einzelproben aus der Verdünnungsreihe wurden 90' bei 37°C sowie 30' bei 4°C inkubiert. Die Suspensionen wurden dann vorsichtig aufgeschüttelt und unter dem LiMi wurde die Agglutination festgestellt.

5.6.3. Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (56)

In diesem Test wurden präzipitierende Antikörper der Antiseren gegen Rattenserum, -leber und -niere, proteose peptone und beefheard gesucht. Nach einer bei Thierfelder et alii (71) beschriebenen Methode wurde Rattenleber und -niere zu einem für die Geldiffusion brauchbaren Extrakt präpariert. Leber und Niere wurden aus der narkotisierten Ratte entnommen, mit der Schere zerkleinert und im Potterschen Apparat weiter aufgeschlossen. Diese Gewebsmasse wurde innerhalb

12 Std. zweimal tiefgefroren und wieder aufgetaut. Zu diesem Organbrei gab man das doppelte Volumen 0,9 %iges NaCl und zentrifugierte das Gemisch 10' bei 6000 xg. Der milchig opale Überstand wurde für die Geldiffusion mit 0,9 %igem NaCl 1:5, für die KBR 1:50 verdünnt.

Auf den Platten wurden in den Agar nach Schablone Löcher gesaugt (s.u.), die mit den zu testenden Antigenen und Antisera gefüllt wurden. Die Reagenzien diffundierten in einer feuchten Kammer 18-24 Std. gegeneinander. Luftgetrocknet wurden die Agarplatten dann mit Amidoschwarz gefärbt.

(Materialien s.u. 5.7.)



5.6.4. Komplementbindungsreaktion

Es wurde nach komplementbindenden Antikörpern gesucht. Die Antigene wurden nach der oben beschriebenen Methode zubereitet (5.6.3.).

In der 1. Phase wurde das zu testende Serum 30' bei 56°C im Wasserbad inaktiviert. Mit dem Testserum wurde eine geometrische Verdünnungsreihe mit Liebermeierpuffer von 1:1 bis 1:512 angesetzt. Aus dieser Verdünnungsreihe wurde je 1 Tropfen in kleine serologische Röhrchen umgetropft. Aus der 2. und 4. Verdünnungsstufe wurde je ein Tropfen in Kontrollröhrchen gegeben. Nun kam in jedes Röhrchen zusätzlich 1 Tropfen Komplement und 1 Tropfen Antigen. Die Kontrollröhr-

chen enthielten Komplement, aber blieben Antigenfrei (nach Zugabe des hämolytischen Systems müssen die Serumkontrollen vollständige Hämolyse zeigen). Komplement und Antigen werden vor dem Hauptversuch im hämolytischen System ausgetestet. Von beiden Reagenzien wurde die Verdünnungsstufe genommen, die noch mit den 0,6 ml hämolytischen Systems eine vollständige Hämolyse hatten. Das Serum-Komplement-Antigengemisch wurde 90' bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Die 2. Phase wurde durch die Zugabe des hämolytischen Systems (je 0,6 ml) eingeleitet. Noch unverbrauchtes Komplement konnte jetzt in einer 40' Inkubation bei 37°C Hämolyse herbeiführen.

Bei der Ablesung galt die Serumverdünnung als Titer, die noch keine vollständige Hämolyse zeigte (hier hatten schon in der 1. Phase komplementbindende Antikörper reagiert). (Materialien s.u. 5.7.)

5.6.5. In-vivo-Phagozytostest von Tusche

Die Fähigkeit von MP, nach der Einwirkung eines Antiserums in vivo Tuscheartikel zu phagozytieren, wurde getestet.

Die MP wurden wie beschrieben im cavum peritonei von Sprague-Dawley Ratten angereichert (5.3.5.). Nach 48 Std. wurden 2 ml des zu testenden Serums i.p. gespritzt. 90' später wurden 2 ml 0,9 %ige NaCl-verdünnte schwarze Tusche (5:1) nachinjiziert. Das cavum peritonei wurde nach einer weiteren Stunde eröffnet, das graue Exudat mit Hankscher Lösung verdünnt und abgesogen, das Zellmaterial mehrfach bei 500 rpm (Christzentrifuge Rotor Ø 10 cm) gewaschen und in 5 ml Hankscher Lösung suspendiert.

Das Exudat von 3 Ratten war jeweils gepoolt, wurde nach Wright angefärbt und unter dem LiMi beurteilt. Kriterien für die Auszählung der Zellen waren folgende Merkmale: Phagozytierende tuschebeladene MP, unzerstörte MP, die nicht phagozytiert hatten und als 3. Gruppe agglutinierte oder lysierte MP. Von jedem gepoolten Exudat (insgesamt 5)

wurden 3 Gesichtsfelder vollständig nach den genannten 3 Gesichtspunkten differenziert und das jeweilige arithmetische Mittel in Prozent angegeben.

5.6.6. In vitro-Phagozytose von Humanerythrozyten

Peritonealzellen wurden wie beschrieben aus der Bauchhöhle von Spague-Dawley Ratten gewonnen. Die PZ von 5 Ratten wurden bei 500 rpm (10 cm Rotor Ø) in Hankscher Lösung gewaschen, in Medium 199 (2 ml) und im Serum der 5 Ratten (5 ml) suspendiert. Zellsuspension und das zu testende Serum wurden im Volumenverhältnis 1:1 90' bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Dann wurden gewaschene Humanerythrozyten zugegeben. In der Testmischung wurde zwischen Peritonealzellen und Humanerythrozyten ein Mengenverhältnis von 1:10 hergestellt. Aus den Teströhrchen, die bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert waren, wurden nach 60 und 210 Minuten kleine Proben entnommen, nach Wright angefärbt und unter dem Mikroskop nach den unter 5.6.5. angegebenen Kriterien differenziert. Als phagozytierend wurden MP betrachtet, die Pseudopodien ausbildeten und deren Pseudopodien mit Erythrozyten kontaktierten. Pro Probe wurden 5 Gesichtsfelder gezählt und wie unter 5.6.5. prozentual ausgewertet.

5.7. Materialien und Geräte

Sprague-Dawley Ratten	Tierzucht Bäumler Wolfratshausen
Kaninchen	Händler Riedl, Feldmoching
Rattenfutter	Altronin, Altrogge, D 4937 Lage/ Lippe
beefheard	Fa. Difco, Detroit USA, Vertrieb:
proteose peptone	O. Nowald, Hamburg
Medium 199	
Meerschweinchenkomplement (guinea pig complement)	Fa. Hyland USA
Freundsches Adjuvans	
Potterscher Apparat	Fa. Braun - Melsungen BRD
Histoacryl-N-blau Kleber	
Chloramphenicol (Paraxin)	Fa. Böhringer BRD
Terrylen	Fa. Höchst, Trevira Kardenbach BRD
EDTA	Apotheke der Stadt München
Chloralhydrat 3,6 %	
Hanksche Lösung	
Vitalblau (Trypanblau)	
Tusche (schwarz)	Fa. GEHA BRD
Pilca	Olivin
Zentrifugen	Fa. Christ BRD (Rotor: 25 und 10 cm)

Materialien für den Test nach Ouchterlony (5.7.3.):

Große Glasplatten (12,5 ml Agar), Diaplättchen (2,5 ml Agar),
Objektträger (2,5 ml Agar)

2 %iger Agar Herstellung:

0,2 g Agar von Behring Nr. 9253 in 10 ml Agarosepuffer aufkochen.

1,5 %iger Agar Herstellung:

1,5 g Agar w.o. oder Agarose von Behring Nr. 871 in 100 ml Agarosepuffer aufkochen und auf ca. 50°C abkühlen lassen.

Agarosepuffer:

Diäthylbarbitursäurenatriumsalz	24,74 g
Calciumlactat	1,54 g
Natriumazid	0,2 g

auf 950 ml mit aqua bidest. auffüllen, pH mit 1 n HCL auf 8,6 einstellen und genau auf 1000 ml auffüllen.

Färben der Ouchterlonyplatten mit Amidoschwarz:

Die mit 0,9 %igem NaCl ausgewaschenen und luftgetrockneten Platten für 5-10 Minuten in 1 %ige Amidoschwarzlösung legen, je nach Stärke der Präzipitationslinien. 10-20 Minuten in Entfärbelösung legen, evtl. wiederholen. Lufttrocknen.

Amidoschwarzlösung:

Amidoschwarz Fa. Merck	1 g
Natriumazetat x 3 H ₂ O	6,12 g
Glyzerin 30 %	100 ml
Eisessig 96 %	2,6 ml

alles in 900 ml aqua bidest. lösen

Entfärberlösung:

Methanol/Eisessig 96 % 9:1 mischen.

Materialien für die KBR (5.7.4.):

Liebermeisterpuffer:

Stammlösung:

1. Lösung: 9,42 g MgCl_2

3,3 g CaCl_2 ohne Kristallwasser

oder 4,41 g $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$

mit 90 ml aqua dest. auf dem Bunsenbrenner kochen, bis die Lösung klar ist. Auf genau 100 ml mit aqua dest. auffüllen und bei 4°C aufbewahren.

2. Lösung: 42,5 g NaCl

1,875 g Barbital Na

in einem 1000 ml Messkolben in ca. 700 ml aqua dest. auflösen

3. Lösung: 2,875 g Barbital Na

in 200 ml aqua dest. im Becherglas kochen, bis Lösung klar ist. Abkühlen.

Lösung 3 zu Lösung 2 geben, dazu 2,5 ml von Lösung 1 und mit aqua dest. auf genau 1000 ml auffüllen. Bei 4°C aufbewahren.

Gebrauchslösung:

Stammlösung mit aqua dest. 1:5 verdünnen.

Hämolysinlösung:

Schafszellhämolysin entspricht Ambozeptor 1:6000 von Behringwerken Nr.

2 ml Ambozeptor

+ 4 ml 5 %ige wässrige Phenollösung

mit 0,9 %igem NaCl auf 100 ml im Meßkölbchen auffüllen.

Bei 4°C im Kühlschrank aufbewahren.

5-%ige Phenollösung:

5 g Phenol in 100 ml aqua bidest. auflösen.

Gelatinelösung:

0,5 g Blattgelatine abwiegen und in 100 ml Veronalpuffer aufkochen, bis alles gelöst ist.

Hämolysin:

Ambozeptor 1:6000 1:20 mit Veronalpuffer verdünnen.

Veronalpuffer:

5,75 g 5,5 n Diäthylbarbitursäure wird in
1400 ml heißem aqua dest. gelöst. Abkühlen. Dazu gibt man
85 g NaCl
3,75 g Na Barbital
5 ml 1 M $MgCl_2$ Lösung
1,5 ml 1 M $CaCl_2$ Lösung
diese Mischung fast bis auf
2000 ml mit aqua dest. auffüllen und entweder mit NaOH oder
HCl auf pH 7,4 einstellen. Dann genau bis zur Marke
2000 ml auffüllen.

Diese Stammlösung bei 4°C aufbewahren und als Gebrauchs-
lösung 1:4 mit aqua dest. verdünnen.

6. Ergebnisse
 =====

6.1. Phagozytostests

6.1.1. Intraperitoneale Phagozytose von Tusche-
 nach i.p. Injektion von NKS₁^{*} bzw. AMS₁^{*} bei Ratten

Die MP wurden im cavum peritonei von Sprague-Dawley Ratten angereichert (s. 5.2.1.). Den Ratten wurden i.p. einmalig 2 ml des Testserums injiziert, nach 90' wurden 2 ml mit 0,9 %igem NaCl 1:5 verdünnte schwarze Tusche i.p. nachinjiziert, nach weiteren 90' wurden die Peritonealzellen aus dem cavum peritonei gewonnen, in Hankscher Lösung gewaschen, angefärbt und unter dem LiMi nach den in der Tabelle 1 angegebenen Gesichtspunkten beurteilt (s.a. 5.7.5.).

Tabelle 1: Wirkung von NKS₁^{*} bzw. AMS₁^{*} auf die intra-
 peritoneale Phagozytose von Tusche-
 partikeln
 bei Ratten:

Seren [*]	unzerstörte MP in %	lysierte oder agglutinierte MP in %	tuschephagozytie- rende MP in %
NKS ₁ [*]	7	15	78
AMS ₁ [*]	2	86	12

Erläuterungen: NKS₁ = erythrozytenabsorbiertes Normalkaninchenserum, AMS₁ = erythrozytenabsorbiertes Kaninchenserum gegen Rattenmakrophagen; Versuchsablauf: 1 x 2 ml des Testserums i.p., nach 90' 2 ml Tusche i.p., nach weiteren 90' LiMi Auswertung der Peritonealzellen.

* Zur Herstellung der Seren s. 5.3.

In Anwesenheit des NKS₁^{*} phagozytieren über 75 % der MP in vivo Tuscheartikel. Weniger als 10 % der MP bleiben unzerstört und tuschefrei. 15 % der MP werden agglutiniert oder lysiert. Lysierte MP sind meist mit Tuscheartikeln durchsetzt.

Das AMS₁^{*} agglutiniert oder lysiert über 80 % der MP und Monozyten im cavum peritonei der Ratten. Auch hier sind zerstörte MP von Tuscheartikeln retikulär beladen. Tuschefreie unzerstörte MP fehlen nahezu. Über 10 % der MP hatten aber phagozytiert.

Zusammenfassend läßt sich sagen: Das AMS₁ stoppt die Phagozytose der Peritonealmakrophagen bei fast 90 % der Zellen, das NKS₁ stoppt sie nicht bei über 75 % der Zellen.

6.1.2. In_vitro-Phagozytose_von_Humanerythrozyten_nach_Inkubation_von_NKS₁^{*}_ALS₁^{*}_bzw._AMS₁^{*}_mit_Peritonealmakrophagen_von_Ratten

Gewaschene Peritonealphagen von je 5 Sprague-Dawley Ratten wurden in 2 ml Medium 199 und 5 ml autologem Serum suspendiert. Zu Teilvolumina dieser Zellsuspension wurden jeweils das gleiche Volumen des Testserums gegeben. Diese Testmischung wurde 90' bei 37°C inkubiert, dann wurden Humanerythrozyten zugegeben (Zellverhältnis: Peritonealmakrophagen/Humanerythrozyten 1:10), Inkubation bei 37°C. Nach 60' und 210' wurden Proben zur LiMi-Untersuchung entnommen.

* Zur Herstellung der Seren s. 5.3.

Tabelle 2: Wirkung von NKS₁^{*}, ALS₁^{*} bzw. AMS₁^{*} bei Rattenperitonealmakrophagen auf die in vitro-Phagozytose von Humanerythrozyten

Seren	unzerstörte		lysierte oder		phagozytierende	
	MP in %		agglutinierte		MP in %	
	nach		MP in %		nach	
	60'	210'	60'	210'	60'	210'
NKS ₁ [*]	11	7	10	22	79	71
ALS ₁ [*]	2	1	22	19	76	80
AMS ₁ [*]	9	4	78	74	13	22

Erläuterungen: NKS₁ = erythrozytenabsorbiertes Normalkaninchenserum, ALS₁ = erythrozytenabsorbiertes Kaninchenserum gegen Rattenlymphozyten, AMS₁ = erythrozytenabsorbiertes Kaninchenserum gegen Rattenmakrophagen (alle 3 Seren mit Rattenerythrozyten absorbiert); Versuchsablauf: MP von 5 Ratten in 2 ml Medium 199 und 5 ml autologem Serum suspendiert, Teilvolumen dieser Zellsuspension mit gleichem Volumen des Testserums bei 37°C inkubiert, nach 90' Zugabe der Humanerythrozyten (MP/Ery 1:10), Inkubation auch bei 37°C, nach weiteren 60' bzw. 210' Entnahme der Proben zur LiMi-Auswertung (s.a. Einleitung dieses Kapitels und 5.7.6.).

Nach 90' in vitro-Einwirkung von NKS₁, ALS₁ bzw. AMS₁ auf Rattenperitonealmakrophagen hat die unterschiedliche Phagozytosedauer keinen wesentlichen Einfluß mehr auf die in Tabelle 2 untersuchten Kriterien.

* Zur Herstellung der Seren s. 5.3.

Wesentliche Unterschiede entstehen durch die verschiedenen Testseren. NKS₁ und ALS₁ haben etwa die gleiche Phagozytose-rate, nämlich um 75 %. Das AMS₁ verhindert die Phagozytose bei 75 % der MP durch seine lysierende und agglutinierende Wirkung.

6.2. Serologische Untersuchungen der verschiedenen Test-
seren^{*} (NKS, NKS₁, ALS, ALS₁, AMS₁, AMS₂, AMS_{3a},
AMS_{3b})^{*}

6.2.1.: Präzipitierende Antikörper der hergestellten Kanin-
chenser^{*}en gegen Antigene in Rattenserum und Ratten-
gewebe (NKS)

Im Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony (48) wurden folgen-
de Seren getestet: Ein unabsorbiertes Normalkaninchenserum
(NKS), ein rattenerythrozytenabsorbiertes Normalkaninchen-
serum (NKS₁), ein rattenerythrozytenabsorbiertes Kaninchen-
serum gegen Rattenlymphozyten (ALS₁), ein mit Erythrozyten
und Lymphozyten von Ratten absorbiertes Kaninchenserum gegen
Rattenlymphozyten (ALS₂), ein rattenerythrozytenabsorbiertes
Kaninchenserum gegen Rattenmakrophagen (AMS₁), ein mit Ery-
throzyten und Lymphozyten von Ratten absorbiertes Kaninchen-
serum gegen Rattenmakrophagen (AMS₂), ein unabsorbiertes
Kaninchenserum gegen Rattenmakrophagen, hergestellt mit
Freundschem Adjuvans (AMS_{3a}), ein rattenerythrozytenabsor-
biertes Kaninchenserum gegen Rattenmakrophagen, hergestellt
mit Freundschem Adjuvans (AMS_{3b}).

In keinem der Tests konnten präzipitierende Antikörper gegen
Rattenserum, -leber und -niere, auch nicht gegen Verunreini-
gungen (proteose peptone und beefheard) im Immunisierungsma-
terial für die Antimakrophagenseren nachgewiesen werden.

* Definition der Seren s. 6.2.1., Herstellung der Seren
s. 5.3.

6.2.2. Komplementbindende Antikörper der hergestellten Kaninchenserum* gegen Antigene aus Rattengewebe

Tabelle 3: Antikörpertiter der Testseren* gegen Ratten-
niere, -leber, proteose peptone/beefheard** in
der Komplementbindungsreaktion

Seren*	absorbiert mit	Rattenniere KBR - Titer	Rattenleber KBR - Titer	proteose peptone/ beefheard KBR - Titer
NKS	---	1 : 1	1 : 1	1 : 1
ALS	---	1 : 32	1 : 32	1 : 2
ALS ₁	Rattenerythroz.	1 : 2	1 : 2	1 : 2
AMS ₁	Rattenerythroz.	1 : 1	1 : 1	1 : 2
AMS ₂	Rattenerythroz. und Lymphoz.	1 : 1	1 : 1	1 : 1
AMS _{3a}	---	1 : 16	1 : 8	1 : 2
AMS _{3b}	Rattenerythroz.	1 : 4	1 : 2	1 : 2

Erläuterungen: * Definition der Seren s. 6.2.1., Herstellung der Seren s. 5.3., ALS = unabsorbiertes Kaninchenserum gegen Rattenlymphozyten, KBR = Komplementbindungsreaktion, ** s. 5.2.1..

Komplementbindende Antikörper gegen Rattenleber und -niere lassen sich in unabsorbierten Kaninchenserum* gegen Rattenlymphozyten und Rattenmakrophagen (ALS, AMS_{3a}) nachweisen. Nach der Absorption mit Rattenerythrozyten lassen sich in den Kaninchenserum* (ALS₁, AMS₁)* mit Ausnahme des AMS_{3b}* keine komplementbindenden Antikörper mehr nachweisen. Eine zusätzliche Absorption mit Lymphozyten scheint in diesem Zusammenhng belanglos (AMS₂)*.

* Definition der Seren s. 6.2.1., Herstellung der Seren s. 5.3.

Komplementbindende Antikörper gegen Verunreinigungen im Immunisierungsmaterial für die Kaninchenantirattenmakrophagenseren wurden nicht gefunden. Bei den Verunreinigungen handelt es sich um Proteine und Peptide aus proteose peptone und beefheard^{**}.

6.2.3. Zytotoxische und agglutinierende Wirkung der Testseren^{*} auf Erythrozyten, Lymphozyten und Makrophagen von Ratten

Tabelle 4: MP/LZ - zytotoxische Antikörper, MP/Erythrozyten - agglutinierende Antikörper in Seren^{*}, die mit Erythrozyten, bzw. Erythrozyten und Lymphozyten absorbiert waren

Seren [*]	absorbiert mit	zytotoxischer Antikörpertiter gegen		agglutinierender Antikörpertiter gegen	
		MP	LZ	MP	ERY
NKS	---	1 : 2	1 : 2	---	1 : 4
NKS ₁	Rattenerythrozyt.	1 : 1	1 : 1	1 : 1	1 : 1
ALS ₁	Rattenerythrozyt.	1 : 4	1 : 64	---	1 : 2
ALS ₂	Rattenerythrozyt. und -lymphoz.	1 : 1	1 : 8	---	1 : 8
AMS ₁	Rattenerythrozyt.	1 : 64	1 : 2	1 : 64	1 : 2
AMS ₂	Rattenerythrozyt. und -lymphoz.	1 : 32	1 : 2	1 : 32	1 : 1
AMS _{3b}	Rattenerythrozyt.	1 : 512	1 : 4	---	1 : 4

Erläuterungen: MP = Rattenperitonealmakrophagen, LZ = Lymphozyten aus defibriniertem Rattenblut, ERY = Rattenerythrozyten, Seren^{*} = Definition s. 6.2.1., Herstellung s. 5.3.

^{*} Definition der Seren s. 6.2.1., Herstellung s. 5.3.

^{**} s. 5.2.1.

Das AMS₁, ein rattenerythrozytenabsorbiertes AMS, hat im zytotoxischen Test einen Antikörpertiter von 1 : 2 gegen LZ, im Agglutinationstest einen Antikörpertiter von 1 : 2 mit Erythrozyten. Antikörpertiter in diesem Bereich lassen sich nicht von den Kontrollen mit 0,9 %igem NaCl unterscheiden.

Zytotoxische und agglutinierende Antikörper gegen MP lassen sich bis zur 64fachen Verdünnung dieses AMS₁ nachweisen. Nahezu analog verhält sich das ALS₁, ein rattenerythrozytenabsorbiertes ALS, mit einem zytotoxischen Titer gegen LZ von 1 : 64, gegen MP von 1 : 4 und einem Hämagglutinationstiter von 1 : 2.

In einer weiteren Studie wurde die zytotoxische und agglutinierende Wirkung eines rattenerythrozytenabsorbierten ALS bzw. AMS nach Absorption mit Lymphzellen, präpariert aus Thymus und mesenterialen Lymphknoten von Ratten, geprüft.

Es fand sich bei dem ALS₁ nach der Absorption mit Lymphozyten ein Abfall des zytotoxischen Antikörpertiters von 1 : 64 auf 1 : 8, der zytotoxische Antikörpertiter dieses Serums veränderte sich von 1 : 4 auf 1 : 1.

Bei dem AMS₁ verlagern sich durch die gleiche Absorption mit Lymphozyten die zytotoxischen und agglutinierenden Antikörpertiter gegen MP von 1 : 64 nach 1 : 32. Eine Veränderung der zytotoxischen Antikörperkonzentration gegen LZ in diesem AMS₁ nach Lymphozytenabsorption läßt sich, verglichen mit der NaCl-Kontrolle, nicht feststellen.

Serologisch getestet wurde auch ein AMS, das mit Freund-schem Adjuvans hergestellt und mit Rattenerythrozyten absorbiert war (AMS_{3b}). Der zytotoxische Antikörpertiter dieses AMS_{3b} lag mit 1 : 512 deutlich über dem des AMS₁, allerdings lagen auch die zytotoxischen Antikörpertiter gegen LZ und der Hämagglutinationstiter über dem des AMS₁ und dem Kontrollwert mit 0,9 %igem NaCl.

Kontrollserum für all die bisher erwähnten Seren bei der

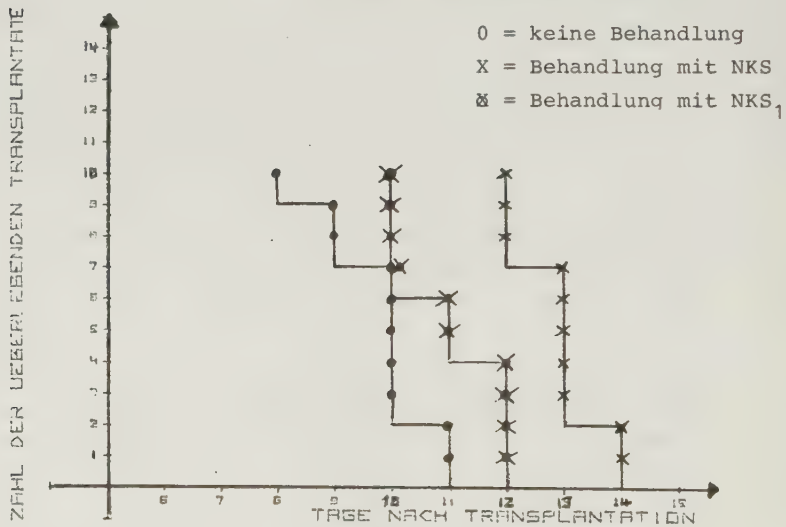
Kaninchenhauttransplantation auf Ratte wurde ein ratten-erythrozytenabsorbiertes Normalkaninchen Serum (NKS₁), das sich in seiner zytotoxischen und agglutinierenden Aktivität gegen MP, LZ und Erythrozyten von Ratten wie 0,9%iges NaCl verhielt (durchwegs Titer 1 : 1).

Ein unabsorbiertes Normalkaninchen Serum (NKS) ließ sich mit den serologisch/mikroskopischen Methoden von einem NKS₁ nur durch den Hämagglutinationstiter unterscheiden. NKS 1 : 4, NKS₁ 1 : 1.

6.3. Wirkung der Seren^{*} (NKS, NKS₁, ALS₁, ALS₂, AMS₁, AMS₂, AMS_{3b}) auf die Überlebenszeit xenogener Hauttransplantate

6.3.1. Kontrollstudien mit unbehandelten Ratten und nach Behandlung mit NKS und NKS₁

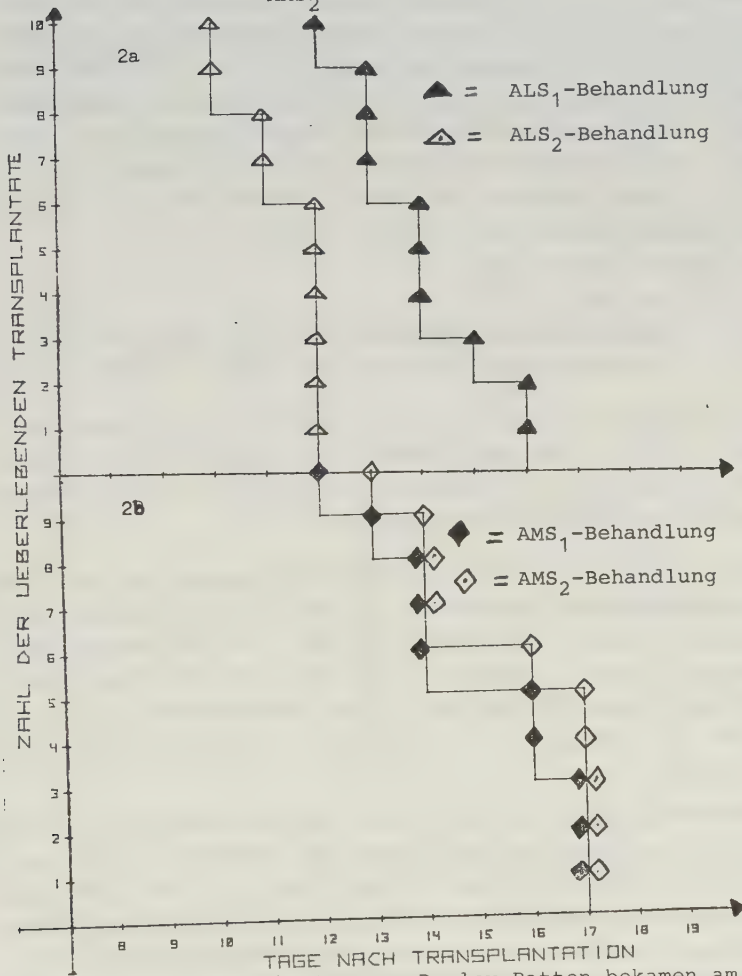
Abbildung 1: Überlebenszeit xenogener Kaninchenhauttransplantate auf Sprague-Dawley Ratten ohne Serumbehandlung und bei Behandlung mit NKS^{*} und NKS₁



Erläuterungen: Serumbehandelte Sprague-Dawley Ratten bekamen am 1., 3., 5. Tag nach Hauttransplantation 2 ml NKS bzw. NKS₁ i.p.; * NKS = Normalkaninchenserum, NKS₁ = rattenerythrozytenabsorbiertes Normalkaninchenserum.

* Definition der Seren s. 6.2.1., Herstellung s. 5.3.

Abbildung 2a/2b: Überlebenszeit xenogener Kaninchenhauttransplantate auf Sprague-Dawley Ratten nach Behandlung mit ALS_1/ALS_2^* und AMS_1/AMS_2^*



Erläuterungen: Die Sprague-Dawley Ratten bekamen am 1., 3., 5. Tag nach Hauttransplantation 2 ml der Testseren i.p.; ALS_1/AMS_1 = rattenerythrozytenabsorbierte Kaninchenantirattenlymphozyten bzw. -antirattenmakrophagenseren; ALS_2/AMS_2 = rattenerythrozyten- und rattenabsorbierte ALS bzw. AMS

Xenogene Kaninchenohrenhauttransplantate bei Sprague-Dawley Ratten hatten auf Tieren ohne Serumbehandlung eine durchschnittliche Überlebenszeit von $9,8 \pm 0,9$ Tagen (Arithmetisches Mittel $\pm$ Standardabweichung). Bekamen die Versuchsratten am 1., 3., 5. Tag nach Hauttransplantation 2 ml NKS i.p. wurden die Transplantate nach $12,9 \pm 0,7$ Tagen abgestoßen. Bei Applikation eines rattenerythrozytenabsorbierten NKS (= NKS₁) unter sonst gleichen Versuchsbedingungen überlebten die xenogenen Hauttransplantate durchschnittlich 11 $\pm$ 0,9 Tage: Dies galt als Vergleichszeit für alle Versuche mit rattenerythrozytenabsorbierten AMS und ALS.

6.3.2. Behandlung der Empfängertiere mit AMS₁, ALS₁ und lymphzellenabsorbierten AMS₁, ALS₁ (= AMS₂, ALS₂)

Es interessierte hier die Wirkung rattenerythrozytenabsorbierter AMS und ALS nach zusätzlicher Lymphzellenabsorption dieser Seren auf das Überleben xenogener Kaninchenhauttransplantate bei Sprague-Dawley Ratten.

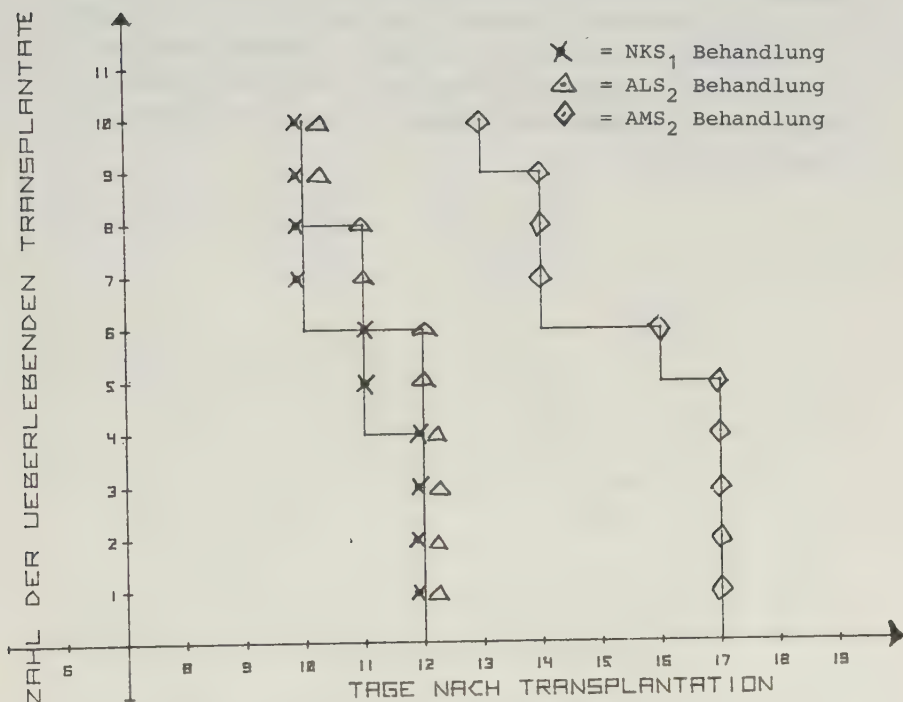
Abbildung 2b zeigt nahezu gleiche Überlebenszeiten bei 2 Versuchskollektiven. Es handelt sich um die Abstoßung der Hauttransplantate bei Applikation des AMS₁ und des lymphzellenabsorbierten AMS₁ = AMS₂. Auch in der mittleren Überlebenszeit der Transplantate kommt diese starke Annäherung zum Ausdruck: AMS₁-Serie = $15,0 \pm 1,8$ Tage, AMS₂-Serie $15,6 \pm 1,6$ Tage.

In Abbildung 2a zeigen die Kurven einen deutlichen Unterschied der Transplantatsüberlebenszeiten der beiden Kollektive an. Gegenübergestellt ist die Wirkung eines ALS₁ der eines ALS₂, dem lymphzellenabsorbierten ALS₁. Der relevante Unterschied zeigt sich auch in den mittleren Überlebenszeiten der Hauttransplantate: ALS₁-Gruppe = $14 \pm 0,3$ Tage, ALS₂-Gruppe = $11,4 \pm 0,8$ Tage.

* Definition der Seren s. 6.2.1., Herstellung s. 5.3.

6.3.3. Gegenüberstellung der Transplantatsüberlebenszeiten bei Behandlung der Empfängertiere mit AMS₂, ALS₂ und NKS₁

Abbildung 3: Überlebenszeit xenogener Kaninchenhauttransplantate bei Sprague-Dawley Ratten nach Behandlung mit NKS₁, ALS₂ und AMS₂



Erläuterungen: Die Sprague-Dawley Ratten bekamen am 1., 3., 5. Tag nach Hauttransplantation 2 ml des jeweiligen Serums i.p.; NKS₁ = rattenerythrozytenabsorbiertes Normalkaninchenserum, ALS₂, AMS₂ = rattenerythrozyten- und rattentlymphozytenabsorbierte Kaninchenseren gegen Rattenmakrophagen und Rattentlymphozyten

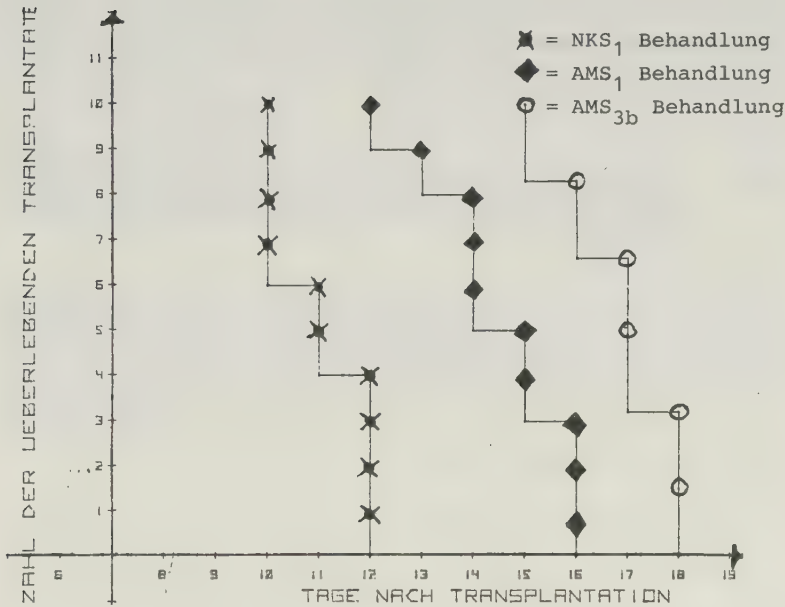
* Definition der Seren s. 6.2.1., Herstellung s. 5.3.

Ratten, die mit einem ALS, absorbiert mit Rattenerythrozyten und Rattenlymphozyten, behandelt wurden, behielten ihre Transplantate etwa so lange wie Ratten, die mit dem Kontrollserum, einem rattenerythrozytenabsorbierten Normalkaninchen-serum behandelt wurden. Die mittleren Überlebenszeiten der Hauttransplantate dieser beiden Versuchsserien mit NKS_1 und ALS_1 fallen nahezu zusammen: Bei dem ALS_2 sind es $11,4 \pm 0,8$ Tage, bei dem NKS_1 $11 \pm 0,9$ Tage.

Ratten, die mit einem AMS, absorbiert mit Rattenerythrozyten und Rattenlymphozyten, behandelt wurden, behielten ihre Hauttransplantate verglichen mit den beiden anderen Versuchsserien deutlich länger. Die Abbildung zeigt dies ebenso wie die mittlere Überlebenszeit dieser Transplantate: $15,6 \pm 1,6$ Tage.

6.3.4. Wirkung eines AMS auf das Überleben xenogener Hauttransplantate bei Ratten, das mit Freundschem Adjuvans hergestellt und mit Rattenerythrozyten absorbiert wurde (AMS_{3b})

Abbildung 4: Überlebenszeit xenogener Hauttransplantate auf Sprague-Dawley Ratten bei Behandlung mit NKS₁, AMS₁ und AMS_{3b}



Erläuterungen: Die Sprague-Dawley Ratten bekamen am 1., 3., 5. Tag nach Hauttransplantation 2 ml des jeweiligen Serums i.p.; NKS₁ = rattenerythrozytenabsorbiertes Normalkaninchenserum, AMS₁ = rattenerythrozytenabsorbiertes Kaninchenserum gegen Rattenmakrophagen, AMS_{3b} = mit Freundschem Adjuvans hergestelltes und mit Rattenerythrozyten absorbiertes Kaninchenserum gegen Rattenmakrophagen.

Nach der Behandlung mit AMS_{3b} überlebten noch 6 von 10 Ratten den Tag der Abstoßung ihrer Hauttransplantate. 4 waren tot, ohne ihre Hauttransplantate abgestoßen zu haben. Sie wurden in Abbildung 4 nicht berücksichtigt, gingen auch nicht in die Berechnung der mittleren Überlebenszeit dieser Zehnergruppe mit ein.

Die restlichen 6 Tiere behielten ihre xenogenen Hauttransplantate länger als die mit AMS₁ behandelte Gruppe. Die mittlere Überlebenszeit der Transplantate bei der AMS_{3b}-Restgruppe beträgt 17,5 +/- 1,6 Tage.

Zum Vergleich dazu die NKS₁-Kontrollgruppe hat eine mittlere Überlebenszeit ihrer Hauttransplantate von 11 +/- 0,9 Tage, die AMS₁-Gruppe 15 +/- 1,8 Tage.

6.4. Serologische Aktivität der Seren^{*} im Vergleich mit ihrer Wirkung auf das Überleben xenogener Hauttransplantate

Aus den vorliegenden Versuchsergebnissen bot es sich an, in vitro-Eigenschaften zellspezifischer Antikörper ihre in vivo-Eigenschaften gegenüberzustellen. Verglichen wurde der zytotoxische Titer gegen MP und LZ mit der mittleren Überlebenszeit der xenogenen Kaninchenhauttransplantate bei Verwendung des jeweils gleichen Serums.

* Definition der Seren s. 6.2.1., Herstellung s. 5.3.

Tabelle 5: Wirkung der Seren auf die Transplantatsüberlebenszeit bei Sprague-Dawley Ratten und im zytotoxischen Test

Seren *	absorbiert mit	Serie (n =)	erzielte mittlere Transplantats- lebenszeit (Tage)	zytotoxischer Anti- körpertiter gegen MP	LZ
NKS	---	10	12,9 +/- 0,7	1 : 2	1 : 2
NKS ₁	Rattenerythroz.	10	11,0 +/- 0,9	1 : 1	1 : 1
ALS ₁	Rattenerythroz.	10	14,0 +/- 1,3	1 : 4	1 : 64
ALS ₂	Rattenerythroz. und -lymphoz.	10	11,4 +/- 0,8	1 : 1	1 : 8
AMS ₁	Rattenerythroz.	10	15,0 +/- 1,8	1 : 64	1 : 2
AMS ₂	Rattenerythroz. und -lymphoz.	10	15,6 +/- 1,6	1 : 32	1 : 1
AMS _{3b}	Rattenerythroz.	6	17,5 +/- 1,6	1 : 520	1 : 4

Erläuterungen: * Definition der Seren s. 6.2.1., Herstellung s. 5.3.; MP = Peritonealmakrophagen von Sprague-Dawley Ratten, LZ = Lymphozyten aus defibrinierten Blut von Sprague-Dawley Ratten

Eine Verbindung zwischen serologischer Wirksamkeit und entsprechender Verlängerung der Transplantatsüberlebenszeit ist ablesbar. Höhere zytotoxische Titer gegen MP oder LZ fallen mit längeren Überlebenszeiten der Hauttransplantate zusammen, niedrige oder vernachlässigbare Titer mit schnellerer Abstoßung der Transplantate.

Spezifische Aussagen lassen sich nur für die Seren* NKS, NKS₁, AMS₁ und AMS₂ machen, die entweder keine nachweisbaren zytotoxischen Antikörper haben oder nur gegen eine Zellart,

* Definition der Seren s. 6.2.1., Herstellung s. 5.3.

in diesem Fall gegen MP.

Für das ALS₁ und das AMS_{3b} lassen sich keine so spezifischen Aussagen machen. In beiden Seren lassen sich zytotoxische Antikörper gegen MP und LZ nachweisen, allerdings sind es im ALS₁ größtenteils lymphozytotoxische, im AMS_{3b} fast ausschließlich makrophagenzytotoxische Antikörper.

7. Diskussion =====

7.1. Allgemeiner Teil

7.1.1. Die Zelle „Makrophage“

Vor der Erörterung der Immunsuppression bei xenogenen Transplantationsantigenen durch ein spezifisches Antimakrophagen-serum scheint es sinnvoll, näher auf den Zelltyp des MP einzugehen (Übersichtsarbeit von Pearsall N.N. and R.S. Weiser, 58).

MP sind phylogenetisch alte, ontogenetisch sehr früh nachweisbare Zellen. Abhängig von ihrer augenblicklichen Funktion und ihrer hauptsächlichsten Lokalisation im Organismus erreichen sie einen Zelldurchmesser zwischen 10 μ und 30 μ . Ein exzentrischer ovaler oder nierenförmiger Kern wird von reichlich basophilem Zytoplasma umgeben. Zahlreiche Vakuolen, Lysosomen, Phagosomen und Phagolysosomen sind im Zytoplasma verteilt. Auffällig ist die Dichte der Mitochondrien und Ribosomen im physiologisch aktiven MP.

Das sind Voraussetzungen für die Synthese zahlreicher lysosomaler hydrolytischer Enzyme, Interferon und Komplement-untereinheiten. Lipolyse und Liposynthese machen einen wichtigen Teil im Stoffwechsel des MP aus. Phagozytose,

Pinozytose, Mikropinozytose, die Ausbildung von Pseudopodien oder eine Invagination an der undulierenden „unite membrane“ des MP lassen sich bei Kontakt dieser Zellen mit Fremdstoffen oder veränderten autologen Geweben, Zellen oder weiteren Untereinheiten beobachten. Die Kontaktaufnahme kann zufällig, durch Chemotaxis oder durch vorhandene natürliche bzw. gebildete MP-zytophile Antikörper geschehen. Während die Kontaktaufnahme energieunabhängig ist, verläuft die eigentliche Aufnahme der genannten Stoffe durch den MP energie-, temperatur-, pH-abhängig. Außerdem sind Ionen erforderlich wie Ca^{++} und Mg^{++} , Serumfaktoren wie Opsonine, Komplement u.U. auch Agglutinine.

Nach der Aufnahme können die Stoffe lange gespeichert, sofort abgebaut und in einer Art Recycling dem organismuseigenen Stoffwechsel wieder zugeführt werden. Die Speicherung und Abgabe von Serumproteinen und Eisen durch MP sind in den normalen Stoffwechsel integriert.

7.1.2. Der Makrophage im Immunsystem

Geht man davon aus, daß die meisten dieser phagozytierten Fremdstoffe als Antigene im Organismus die Bildung von Antikörpern provozieren, lassen sich MP aus dem zellulären Immunsystem nicht mehr wegdenken. Weithin unbekannt jedoch ist noch die Interaktion von MP und LZ, sind noch die Mediatoren, die während der Immunantwort für Zellkooperation und deren Regulation verantwortlich sind.

Seit Sterzl und Hrubesova (68) und Fishman (21) wird die primäre Antigenbindung als MP-RNS-Antigen Komplex diskutiert, der die Blastentransformation sensitivierter LZ induzieren kann. Jachertz (29) betont in seinen Arbeiten die informative Rolle der MP-RNS bei der Stimulation der antikörperbildenden Zellen. In den genannten Fällen ist allerdings nicht streng geklärt, ob die RNS nicht auch von LZ stammen könnte.

Kölsch (37) beschreibt, daß MP den größten Teil eines Antigens in ihrem lysosomenreichen Zytoplasma abbauen, den kleineren Teil des antigenen Materials an ihrer Oberfläche gebunden halten.

Untersucht wird auch die Rolle zytophiler Antikörper, die einerseits eine Affinität zu Rezeptoren auf der MP-Oberfläche haben, andererseits eine starke Affinität zum Antigen. Sind Antigen und zytophiler Antikörper eine Bindung eingegangen, wird die Affinität zum MP-Rezeptor noch gesteigert (50, 58).

Lohmann (47) beschreibt die zytotoxische Wirkung von MP gegenüber Zielzellen, wenn sie mit einem Faktor bewaffnet sind, der von LZ produziert wird, die Antigenkontakt hatten.

Poulter, Bradley und Turk (63) beschrieben die Rolle der MP als eine Art „Kamikazezellen“, die um den Zeitpunkt der Abstoßung in der Umgebung graft-host kumulieren. Unter Auflösung ihrer lysosomalen Membranen kommt es zur Freisetzung hydrolytischer Enzyme, die in das Transplantatsbett einsprossende Fibrozyten und Gefäße lysieren. Das Transplantat wird abgestoßen,

In vielen Abschnitten des afferenten und efferenten Schenkels der Immunantwort wird dem MP eine Rolle zugeschrieben.

7.1.3. Zelluläre immunologische Versuchsmodelle mit MP

Drei Versuchsmodelle sind es hauptsächlich, an denen die Immunreaktion ohne Mitwirkung der MP untersucht wird, bzw. in bekannten Einzelfällen durch Substitution mit MP die ausgebliebene Antikörpersynthese wieder in Gang gebracht werden kann:

1. Experimente an immunologisch unreifen Tieren (s. Arbeitsgruppe um Argyris, 3-8)
2. Sublethale Bestrahlung von Versuchstieren (22) oder Bestrahlung von Zellmaterial (21)
3. Versuche mit AMS-behandelten Tieren oder Zellkulturen (3-8, 53, 57, 74)

7.1.4. Ontogenese der MP und Herstellung eines AMS

An die Herstellung eines zellspezifischen Serums gegen Makrophagen ist nur zu denken, wenn die Zellfraktion der MP nicht nur ein funktionelles System ist, sondern auch eine antigene Kongruenz besitzt. In der Literatur spricht man von MP meist ihre funktionelle Bedeutung an, seitdem E. Metchnikoff 1892 diese Eigenschaft der MP herausgestellt hat.

Ihre im besonderen Maße vorhandene Fähigkeit zur Phagozytose und Speicherung von Vitalfarbstoffen läßt sie L. Aschoff 1924

im RES, heute RHS zusammenfassen. Diesem funktionellen Zellsystem rechnet er zu: Gefäßendothelien, Fibrozyten, Retikulumzellen, Sinusendothelien von Milz und Lymphknoten, Kupfersehe Sternzellen, Kapillarendothelien des Knochenmarks, der Nebenniere und der Hypophyse, Histiozyten und farbstoffspeichernde Monozyten.

Die Zugehörigkeit dieser Zellgruppe wird bis heute erörtert. Hinreichend geklärt wird dieses Problem von H.-L. Lutz in seinem 1967 erschienenem Buch „Der Blutmonozyt“. Aufgrund umfangreicher Literaturstudien und eigener Untersuchungen kommt er zu folgenden Ergebnissen:

MP, vor allem Peritonealmakrophagen und die im immunologischen Prozeß verwickelten MP, haben als gemeinsame Vorzelle differenzierte Blutmonozyten.

Die Blutmonozyten sind eine den Granulozyten verwandte Leukozytenart. Sie entwickeln sich beide aus Zellen des Knochenmarks. Auf der Entwicklungsstufe der Promyelozyten sind sie elektronenoptisch und fermentzytochemisch noch nicht genau zu unterscheiden. Durch Anfärben mit spezifischen und unspezifischen Esterasen beobachtet Lutz die weitere Biogenese. In der Entwicklung vom Promyelozyten über den Promonozyten zum reifen Monozyten nimmt die Färbeintensität der spezifischen Esterase ab, die der unspezifischen Esterase zu.

Er lehnt deshalb die These der Trialisten ab, das RHS sei ein biogenetisch dem mesenchymalen Bindegewebe entstammender Zellverband, die Monozyten eine Weiterentwicklung dieser ausdifferenzierten und heterogenen Zellgruppe.

Eine Abstammung der MP, bzw. Monozyten von Lymphozyten schließt er aus, genauso die Hypothese einer beliebig möglichen Umwandlung dieser genetisch genau unterschiedenen Zellfraktionen ineinander.

So folgt als wichtige Vorbedingung für die vorliegende Arbeit:

MP haben eine gemeinsame genetische Vorstufe im Knochenmark. Das bürgt für ihre antigene Gemeinsamkeit, da Antigene auf Zellmembranen ihrerseits Ergebnis einer gemeinsamen genetischen

schen Matritze sind.

Der Versuch, ein AMS aus Peritonealmakrophagen derselben Spezies herzustellen, die an der Immunreaktion beteiligt sind, scheint daher sinnvoll.

7.2. Zur Herstellung eines AMS

Fishman (21), dessen Methode, MP aus dem Peritonealzellexudat von Ratten durch i.p.-Injektion von Proteinen zu gewinnen, hier übernommen wurde, geht auf die prozentuale Zusammensetzung der Zellen seiner Exudate nicht ein. Er spricht von MP, mononukleären Zellen, von gelegentlichen Erythrozytenbeimischungen. Fishman läßt die Frage, ob er aus seinen Peritonealzellexudaten eine reine MP-RNS präparieren kann, unbeantwortet. Auch in der ausführlichen Literaturarbeit von Bishop und Gottlieb (15) über Sensibilisierung von LZ durch den MP-RNS-Antigen Komplex bleibt die Frage nach der spezifischen MP-RNS offen.

Panijel und Cayeux (57) stellen ein AMS her, ähnlich wie Fishman jedoch an Schweizer Mäusen. Sie schlüsseln ihr Peritonealzellexudat wie folgt auf: 80-85 % MP, 10-15 % LZ, 3-5 % polymorphnukleäre Zellen.

In einem zytotoxischen Test gegen LZ und MP stellen sie eine sofort einsetzende und starke Wirksamkeit gegen MP fest, aber auch einen leichten und verzögerten Effekt gegen LZ. Trotzdem sprechen sie von einem spezifischen Serum.

Die Forschergruppe um Argyris (3-8) geben durchwegs 86 % MP in ihren Exudaten an. Sie überlassen die Frage nach der Spezifität ihrer erythrozytenabsorbierten Seren späteren Untersuchungen.

Unanue (74) präpariert sein Peritonealzellexudat ähnlich wie Fishman. Anschließend kultiviert er sein Exudat 4 Tage in Medium 199 und Kaninchenserum in Jenagläsern. Die nach Schüteln der Gläser am Glas haftenden Zellen sind als MP identi-

fiziert. Es bleiben etwa 25 % Zellen des ursprünglichen Rattenperitonealzellexudats, die zusammen mit Freundschem Adjuvans als Immunisierungsmaterial dienen. Das so gewonnene Serum hat keine agglutinierende Wirkung gegen LZ. Da dieses Serum nicht mit LZ absorbiert wurde, kann es noch unentdeckte antilymphozytäre Antikörper enthalten.

Um die Spezifität der hier verwendeten Seren schon während der Immunisierung anzustreben, also vor allem antilymphozytäre Antikörper auszuschließen, nutzte man während der Herstellung mehrfach die Wirkung eines ebenfalls im Kaninchen-Sprague-Dawley Rattensystem hergestellten ALS.

Dreimal wurde es bei der Herstellung des AMS eingesetzt:

- a. In vivo zusammen mit proteose peptone und beefheard während der Immigration der MP in das cavum peritonei.
- b. In vitro, als die nach 48 Std. gesammelten Peritonealzellen mit Medium 199, Komplement und ALS inkubiert waren.
- c. In vivo, als die Peritonealzellsuspension zusammen mit ALS den Kaninchen injiziert wurde.

Beim Schritt a wurde spezifisch die Zahl der LZ in der MP-Spenderratte herabgesetzt, was dann auch einen Effekt auf die Zusammensetzung des Peritonealzellexudats haben mußte. Auch so wurden bei weitem nicht so hohe MP-Konzentrationen erreicht wie sie in den oben erwähnten Arbeiten angegeben sind. Der Anteil der MP im Peritonealzellexudat betrug so zunächst im Durchschnitt 60 %.

Schritt b machte sich die zytotoxische Wirkung des ALS zusammen mit Meerschweinchenkomplement zunutze. Die Inkubation der Peritonealzellen mit ALS, Komplement und Medium 199 führte zu wesentlich reineren MP-Kulturen, nämlich zu einem MP-Anteil von nahezu 90 %. Sie waren allerdings meist mit Trypanblau färbbar und konnten nicht durchwegs als phagozytosefähig angesehen werden, obwohl unter dem LiMi die morphologischen Strukturen und damit auch die Antigenizität

der Oberflächenmembran erhalten war.

Schritt c sollte durch passive Zuführung spezifischer Antikörper die Bildung dieser Antikörper im Immunisierungstier, dem Kaninchen, unterdrücken. Applikation von ALS sollte durch passives Enhancement die Neuproduktion von antilymphozytären Antikörpern hemmen. Da dieses ALS wahrscheinlich auch Antikörper gegen MP enthielt, würde der gleiche Mechanismus gegen die Potenz eines AMS wirken. Zudem war es unsicher, ob die ALS-Antikörper nicht zu lange im Kaninchen zirkulierten, sodaß ein Teil von ihnen beim Entbluten wiedergewonnen würde. Gestützt wurde dieser Schritt durch die Veröffentlichungen mehrerer Autoren (72 Uhr, 65 Rowley und Fitch).

7.3. Zur Spezifität eines AMS

Die für diese Arbeit hergestellten Seren hatten regelmäßig einen hohen hämagglutinierenden Titer, was mit den Erythrozytenbeimengungen der Peritonealzellexudate zusammenhing. Das war zunächst der Grund, all diese Seren mit Rattenerythrozyten zu absorbieren. Ein Normalkaninchenserum, das auch unabsorbiert getestet wurde, wurde allerdings genauso absorbiert.

Versuche von Jennings und Hughes (33) mit antierythrozytären Seren zeigten neben dem hohen hämagglutinierenden Titer auch starke Wirkung gegen MP und LZ. Folgerichtig wurde mit diesen Seren die Überlebenszeit allogener Transplantate verlängert. Die hochgradige Hämolyse im Empfängertier und andere toxische Wirkungen führten zu zahlreichen lethalen Ausfällen. Immerhin konnte wegen der Transplantatsverlängerung die Wirkung kreuzreagierender Antikörper vermutet werden, die gegen Erythrozyten hergestellt, sich auch gegen MP und LZ dergleichen Spezies richten und so immunsuppressiv wirken.

Umgekehrt liegt der Schluß nahe, daß spezifisch gegen LZ oder MP hergestellte Seren nicht wegen ihrer Zellspezifität, sondern wegen der in diesen Seren enthaltenen kreuzreagierenden

Antikörper immunsuppressiv wirken.

Müller-Hermelink und Müller-Ruchholz (53) absorbierten deshalb ihre Antithymozyten- und Antimakrophagenseren mit Erythrozyten und anderen Gewebearten der Spezies, bis der hämagglutinierende Titer nicht mehr nachweisbar war und der agglutinierende Titer gegen Thymozyten bzw. MP stagnierte. So blieben reproduzierbar immer nur sehr geringe Titer gegen MP und Thymozyten. Daraus wurde gefolgert, daß von zellspezifischen Antikörpern in solchen Seren nicht gesprochen werden kann, vielmehr die kreuzreagierenden Antikörper für den immunsuppressiven Effekt verantwortlich sind.

In der vorliegenden Untersuchung sollte ein ebenso potentes wie zellspezifisches Serum hergestellt werden. Deshalb wurden die Seren nur solange mit Erythrozyten absorbiert, bis der hämagglutinierende Titer entfernt war. Bestärkt wurde diese Methode durch die Ergebnisse aus der Komplementbindungsreaktion und dem Doppeldiffusionstest nach Ouchterlony. Nach Absorption mit Erythrozyten fanden sich in den hier eingesetzten Seren weder komplementbindende noch präzipitierende Antikörper gegen andere Rattenzellarten wie aus Leber- oder Nierengewebe oder gegen Ratten Serumproteine. Sehr wohl waren vor der Absorption mit Rattenerythrozyten in der Komplementbindungsreaktion Antikörper gegen Leber- und Nierenzellen von Sprague-Dawley Ratten zu finden. Allem Anschein nach können mit den auf der Erythrozytenmembran sitzenden Antigenen die hauptsächlich kreuzreagierenden speziesspezifischen Antikörper abgefangen werden. Im Wesentlichen bleibt dann nur die Wirkung der zellspezifischen Antikörper.

Im Falle des Normalkaninchenserums verschwanden durch die Absorption mit Rattenerythrozyten die natürlich im Kaninchen vorhandenen antierythrozytären kreuzreagierenden Antikörper mit Ratten-MP und Ratten-LZ, was sich auch in der entsprechenden Transplantationsserie auswirkte. Diese natürlichen Antikörper kann Colley und Waksman (17) in einem Normalkaninchenserum nachweisen. Sie haben einen zytotoxischen Effekt

auf verschiedene Rattenzellarten, darunter auch Thymuszellen, Lymphozyten und Knochenmarkszellen.

Bezeichnenderweise verschwanden in den serologischen Tests bei den lymphozytenabsorbierten ALS und AMS die antilymphozytären zytotoxischen Titer, während das AMS seine Wirksamkeit gegen MP behielt. Das ließ zumindest zwischen MP und LZ trennbare antigene Eigenschaften vermuten.

Unterstützt wurde dieser Anspruch auf ein zellspezifisches Serum durch die Übereinstimmung mit der Arbeit von Marshman, van der Hart und van Loghem (48) über die antigenen Eigenschaften von MP und LZ. Sie testeten ein hochpotentes AMS (Agglutinationstiter gegen MP 1 : 8000, agglutinierende und zytotoxische Titer gegen LZ 1 : 32). Nach einmaliger Absorption mit LZ ändert sich nichts an der Wirksamkeit gegen MP, die Wirkung gegen LZ in diesem AMS verschwindet. Dreimalige MP-Absorption nimmt dem AMS seine gesamte Wirkung gegen MP und LZ.

Sein untersuchtes ALS ist ebenfalls hoch potent (agglutinierender Titer gegen LZ 1 : 1000, zytotoxischer Titer gegen LZ 1 : 2000, Agglutinationstiter gegen MP 1 : 2000). Nach einmaliger Absorption mit LZ ist hier kein Titer mehr gegen MP oder LZ nachweisbar. Zweimalige Absorption dieses ALS mit MP läßt die Wirkung gegen MP verschwinden, gegen LZ leicht zurückgehen.

Gefolgert wird daraus, daß in einem nicht mit MP absorbierten ALS die in diesem Serum enthaltenen Antikörper gegen MP ein beitragender Faktor zur Immunsuppression sein könnten.

Hinsichtlich eines zellspezifischen Serums ließe sich deshalb fordern, unerwünschte Antikörper durch Absorption entweder mit LZ oder MP zu entfernen.

7.4. Problematik der serologischen Tests

Reine MP-Fraktionen sind nicht nur bei der Herstellung eines AMS, sondern auch für die Austestung dieser Seren in Agglutinations-, zytotoxischen- und Phagozytostests notwendig, ebenso wie etwa zur Gewinnung von MP-RNS.

Ein Problem, das bei der Herstellung eines AMS nicht ins Gewicht fällt, ist dabei die Eigenheit der MP, miteinander zu verkleben. Das macht die Ablesung eines Agglutinationstests schwierig. Es blieb nur die Möglichkeit, den Endtiter bei der Serumverdünnung festzulegen, bei dem die Agglutination nicht mehr abnahm bzw. optisch der 0,9 %igen NaCl-Kontrolle entsprach.

Eine weitere Schwierigkeit war, daß nach Inkubation des Peritonealzellexudats mit ALS viele MP nicht mehr vital waren. Ein zytotoxischer Test, bei dem es auf intakte Membranfunktionen ankommt, ist nicht mehr durchführbar. Kompromisse halfen hier weiter. Das eben gewonnene Peritonealzellexudat wurde ohne Inkubation gleich getestet. Zellverklebungen wurden durch mehrmaliges Aufziehen in eine Spritze vorsichtig gelöst. So blieben die MP funktionsfähig.

Versuche, MP aufgrund ihres spezifischen Gewichts in einem Dichtegradienten von LZ und Granulozyten zu trennen, brachten nicht den gewünschten Erfolg.

7.5. Beurteilung der Phagozytostests

Veränderungen an den MP wie Beeinträchtigung der Phagozytosebereitschaft durch Lyse oder Agglutination, was in diesen Tests beobachtet werden konnte, sollte analog auch in den Transplantatsempfängern parallel zu einer verlängerten Transplantatsüberlebenszeit ablaufen.

Verschiedene Autoren haben einen Funktionsverlust von MP unter AMS-Einwirkung festgestellt. So beobachten Hirsch, Gary und Murphy (28) an MP unter AMS-Einwirkung eine Unterbrechung

ihrer Fähigkeit, Zymosanpartikel zu phagozytieren, die Arbeitsgruppe um Argyris (5, 7) stellt einen Stop der SRBC-Aufnahme fest. Interessanterweise beobachtete Unanue (75), daß auch zerstörte MP Hämocyanin aufnehmen. Offenbar handelt es sich nicht immer um einen aktiven Stoffwechselprozeß. Ähnliches ließ sich auch bei den Phagozytostests in vivo feststellen. Wohl war der weitaus größte Teil der MP zerstört oder agglutiniert, aber gerade in den lytischen MP fanden sich auch nach mehrmaligem Waschen mit Hankscher Lösung reichlich Tuschepartikel. Nachdem Panijel und Cayeux (57) bei mit AMS inkubierten MP festgestellt hatten, daß bereits nach 5 1/2 Minuten der maximale AMS-Effekt erreicht ist, müßte es sich im vorliegenden Test um nicht mehr vitale MP gehandelt haben, die nach der Tuscheinjektion noch passiv mit Tuschepartikeln beladen wurden. Inwieweit die Rolle passiv mit Fremdstoffen beladener MP bei der Immunantwort noch spielbar bleibt, ist zweifelhaft, da eine Verdauung des Fremdstoffes durch MP, eine Bindung von MP-RNS, eine Speicherung oder Bindung des Antigens an Rezeptoren der MP-Oberfläche nur über einen aktiven Stoffwechselprozeß möglich sein dürfte.

Ohnehin scheint diese passive „Antigenaufnahme“ nur bei löslichen Antigenen zu funktionieren.

Im in vivo Phagozytostest mit Humanerythrozyten und AMS ließ sich passive Antigenaufnahme nicht beobachten. Die meisten MP, d.h. etwa 75 % hatten keinen Kontakt mit Humanerythrozyten. Sie hatten die Erythrozyten weder phagozytiert noch mit ihren Pseudopodien invaginiert oder arretiert. Daß in beiden Versuchen unter AMS-Einwirkung Phagozytose stattfand, mag mit der zu geringen Antikörperkonzentration, mit einer zu schlechten Antikörperverteilung zusammenhängen.

Nichtsdestoweniger bleibt Ergebnis dieser beiden Tests, daß unter in vivo und in vitro Einwirkung des hier verwendeten AMS über dreiviertel der getesteten MP ihre Fähigkeit zur Phagozytose verloren.

7.6. AMS in einem xenogenen Hauttransplantationsmodell

7.6.1. Immunologische Beteiligung der MP bei der Abstoßung von Gewebe

Das Nichtangehen von allogenen oder xenogenen Gewebe wird in großem Umfang durch eine zelluläre Immunreaktion vermittelt. Immunlymphozyten und Immunmakrophagen treten in Interaktion.

Poulter, Bradley und Turk (63) beobachtete eine Akkumulation von MP in der Umgebung eines allogenen Hauttransplantats während der Entwicklung der zellulären Immunantwort. MP machen bis zu 50 % der eingewanderten Zellen aus. Sie scheinen histobiochemisch aktiv mit der Synthese von saurer Phosphatase und aggressiver lysosomaler Enzyme. Dadurch kommt es offenbar zum Verlust der lysosomalen Membranen und zur Freisetzung hydrolytischer Enzyme. Sie werden für den Verlust des nutritiven Kontaktes von Transplantat und Empfänger verantwortlich gemacht. Was den Anstoß zu erhöhter Stoffwechselaktivität gibt, bleibt ungeklärt.

Umfassender wird unter anderen Autoren der Abstoßungsprozeß von Pearsall und Weiser (58) beschrieben. Bereits bei der Drainierung des Transplantationsbettes durch die anliegenden Lymphgefäße sehen sie die MP beteiligt als Transporteure und Verarbeiter der Transplantationsantigene. Dann werden MP von benachbarten LZ mit zytophilen Antikörpern „bewaffnet“. Diese MP fungieren dann als Effektorzellen zusammen mit sensibilisierten LZ bei der Zerstörung der transplantierten Zellen. Soweit es um die Rolle der MP bei der Abstoßung transplantierten Gewebes geht, werden noch andere notwendige Substanzen und Mechanismen diskutiert, z.B. ein von MP freigesetztes spezifisches hitzelabiles Zytotoxin, eine Art „Anknabbern“ der antigenen Membran oder auch elektrostatische Veränderungen in der Zellmembran.

Ohne diese Theorien oder Hypothesen weiter untermauern zu können, sollte der zelluläre Charakter der Immunreaktion bei

einem xenogenen Hauttransplantationssystem, die Interaktion von LZ und MP, untersucht werden können dadurch, daß man durch ein hochspezifisches, nicht toxisches, potentes AMS eine Zellfraktion, nämlich die MP, diesem Abstoßungsprozeß möglichst vollständig entzieht.

7.6.2. Antikörperwirkung der hergestellten Seren in vivo

Bei Mäusen und Ratten wurde die Verzögerung der Abstoßung allogener Hauttransplantate durch ein AMS, deren Zellspezifität allerdings kritisch zu werten ist, des öfteren beschrieben (19, 41, 67).

Die Überlebenszeit der xenogenen Hauttransplantate mußte von einer geeigneten Kontrollgruppe ausgehen. Diese Kontrollgruppe wurde mit einem erythrozytenabsorbierten Normalkaninchenserum (NKS₁) behandelt. Damit sollten die natürlichen kreuzreagierenden Antikörper gegen verschiedene Rattenzellarten absorbiert werden. Colley und Waksman (17) beschreiben in einem Normalkaninchenserum zytotoxische Antikörper gegen Thymus-, Lymphknoten- und Knochenmarkszellen und Nierengewebe. Davon ausgehend, daß nach Absorption der ALS und AMS mit Rattenerythrozyten keine kreuzreagierenden speziesspezifischen Antikörper etwa gegen Rattenleber, -niere oder -serum mehr nachweisbar waren, schien die gleiche Präparation auch wegen der präexistenten kreuzreagierenden Antikörper im NKS sinnvoll. Tatsächlich waren zwar in einem nicht absorbierten NKS serologisch keine Antikörper gegen LZ oder MP nachweisbar, wohl aber hämagglutinierende Antikörper. Ein NKS₁ (erythrozytenabsorbiertes Normalkaninchenserum) wiederum bewirkte gegenüber einem NKS eine um 2 Tage kürzere Überlebenszeit der xenogenen Hauttransplantate.

Despont und Cruchaud (18) vergleicht sein erythrozytenabsorbiertes AMS mit einem unabsorbierten NKS. Beide haben etwa den gleichen antikörpersuppressiven Effekt, was er dem antigenen Wettbewerb im Versuchstier zuschreibt.

Antigener Wettbewerb, die Aufteilung der Immunreaktion zwischen xenogenem Transplantat und xenogenem Serum, ließe sich im vorliegenden Modell allenfalls aus der unbedeutenden Differenz in der Transplantatsüberlebenszeit unbehandelter Ratten zu Kontrollratten bzw. zu den Ratten, die mit ALS₂ (rattenerythrozyten- und -lymphozytenabsorbiertes ALS) behandelt wurden, vermuten.

Da die hier interessierenden Seren^{*} NKS₁, ALS_{1,2}, AMS₁₋₃ alle rattenerythrozytenabsorbiert sind, dürften diese Seren relativ zueinander vergleichbar sein, ohne einen antigenen Wettbewerb berücksichtigen zu müssen.

Das Hauptgewicht dieser Arbeit liegt auf der zellspezifischen Wirkung der hergestellten Antimakrophagenseren. Vor allem die Kreuzreaktion eines AMS mit Lymphozyten sollte ausgeschlossen werden.

Es seien hier noch einmal kurz die Schritte zu diesem Ziel hervorgehoben:

Von der gemeinsamen Genese der MP wurde auf ihre gemeinsame spezifische Antigenizität geschlossen.

Auf diese Vorüberlegung hin wurde das AMS hergestellt unter mehrfacher Verwendung eines ALS, wobei auch das Phänomen des passiven Enhancement ausgenutzt wurde.

Die Absorptionsstudien waren ein weiterer wichtiger Baustein zur Absicherung der Zellspezifität der Seren^{*}.

Der eindrucklichste Nachweis einer Zellspezifität bei den rattenerythrozytenabsorbierten Seren^{*} gelang im xenogenen Hauttransplantationsmodell. Ein ALS₁ wurde durch Absorption mit LZ-Antigen auf die Wirksamkeit eines rattenerythrozytenabsorbierten Normalkaninchensерums reduziert. Das gleiche lymphozytäre Antigen konnte einem AMS₁, das methodisch genauso absorbiert wurde wie das ALS₁, nichts von seiner Wirksamkeit nehmen.

^{*} Definition der Seren s. 6.2.1., Herstellung s. 5.3.

Das läßt zumindest den Schluß zu, daß die Antikörper im AMS₂ nicht mehr gegen lymphozytäres Antigen gerichtet sind, daß seine Wirksamkeit nicht auf einem lymphozytotoxischen Effekt beruht. Freilich läßt dieser Absorptionsversuch nicht den Schluß zu, daß aus MP gewonnenes Antigen nur die Antikörper eines AMS neutralisieren kann. Die Absorptionsstudien von Marshman, van der Hart und van Loghem (48) legen vielmehr nahe, daß auch einem ALS die serologisch agglutinierende Aktivität gegen MP durch Absorption mit MP genommen werden kann: Daher ihre vorsichtig geäußerte Vermutung, in einem unabsorbierten ALS könnte die Anti-MP-Wirkung ein „contributing factor“ der Immunsuppression sein.

7.6.3. Zur optimalen Immunsuppression durch ein potentes AMS im xenogenen Hauttransplantationssystem

Ergebnisse mit dem AMS_{3b} (mit Freundschem Adjuvans hergestellt und rattenerythrozytenabsorbiert) unterstützen folgende Überlegung:

Verschiedene Autoren (44, 57, 58 et alii) haben die Generationszeit von MP im Organismus der Ratte mit 48 Stunden angegeben. Panijel und Cayeux (57) empfehlen deshalb für die Dosierung eines AMS einen zeitlichen Abstand von höchstens 2 Tagen. Dabei ist immer noch zu bedenken, daß die Halbwertszeit der im AMS enthaltenen wirksamen Anti-MP- γ -Globuline etwa bei 12 Stunden liegt. Es ist anzunehmen, daß der Abbau der MP zu Klasten länger dauert als die Eliminierung der antimakrophagozytären γ -Globuline.

Folgt man jedoch diesem Dosierungsschema, so hat man - totale Ausschaltung der MP angenommen - durch ein hochtitriges AMS eine Überlebenszeit der Hauttransplantate zu erwarten, die sich zusammensetzt aus der Überlebenszeit von Hauttransplantaten unbehandelter Tiere plus der durch AMS-Einwirkung erzielten Transplantatsüberlebenszeit. Im Versuch endet die optimale AMS-Einwirkungszeit 48 Stunden nach der letzten

AMS-Injektion. Dann begänne sozusagen die Transplantatsüberlebenszeit unbehandelter Tiere.

Im Versuch mit dem AMS_{3b} hieße das: Die Sprague-Dawley Ratten bekamen am 1., 3., 5. Tag postoperativ 2 ml AMS_{3b} i.p.. Die Wirkung - totale Ausschaltung der MP angenommen - würde dann 6 Tage anhalten. Hinzukommen 11 Tage Überlebenszeit, die der Überlebenszeit von Hauttransplantaten unbehandelter Tiere entspricht.

Tatsächlich läßt sich mit dem AMS_{3b} eine Überlebenszeit der Hauttransplantate von durchschnittlich 17,5 Tagen erzielen. Auch theoretisch ist kein wesentlich stärkerer Effekt zu erwarten.

Könnte durch eine längerfristige konsequente Behandlung wiederum mit einem hoch zellspezifischen, potenten, nicht toxischen AMS eine ähnliche im voraus berechenbare Überlebenszeit der xenogenen Hauttransplantate erreicht werden, wäre eine endgültigere Aussage über die Rolle der MP bei der Immunreaktion gegenüber xenogenen Hauttransplantaten denkbar: Totale Eliminierung von MP aus einer zellulär vermittelten Immunreaktion, d.h. erschwertes Anlaufen der Immunreaktion gegenüber xenogenen Transplantationsantigenen.

8. Zusammenfassung
=====

Ausgehend von der Tatsache, daß MP eine Rolle bei der Immunantwort spielen, wurde ein spezifisches xenogenes AMS bei Kaninchen gegen Rattemperitonealmakrophagen hergestellt und seine in vitro- und in vivo-Eigenschaften geprüft.

Bei der Herstellung des AMS wurde auf eine Spezifität des Serums geachtet, insbesondere die Bildung von antilymphozytären Antikörpern sollte vermieden werden.

ALS wurde benutzt, um Lymphozyten aus dem Immunisierungsmaterial zu eliminieren. ALS wurde gleichzeitig mit der Immunisierung der Kaninchen gegeben, um ein passives Enhancement zu erzielen.

Bei der Prüfung der Wirksamkeit des so hergestellten AMS fanden wir:

1. Hemmung der Phagozytosefähigkeiten von Rattenmakrophagen in vitro und in vivo unter AMS-Applikation.
2. Verlängerung der Überlebenszeit von xenogenen Hauttransplantaten auf Ratten unter AMS-Verabreichung.
3. Nachweis einer spezifischen Wirksamkeit des AMS.

9. Literaturverzeichnis
=====

1. Abaca H.N., B. Nolan, Transplantation 4, 618 (1966)
 I.G. Watt and
 M.F.A. Woodruff
2. Adler F.L., Antibody formation initiated in
 M. Fishman and vitro
 S. Dray J. Immunol. 97, 554-558 (1969)
3. Argyris B.F. and Mouse peritoneal cells: their
 B.A. Askonas ability to elicit or produce
 antibody after exposure to antigen
 Immunology 14, 379-392 (1968)
4. Argyris B.F. Role of macrophages in antibody
 production
 J. Immunol. 99, 744-750 (1967)
5. Argyris B.F. Role of macrophages in immunolo-
 gical maturation
 J. exp. Med. 128, 459-467 (1968)
6. Argyris B.F. Effect of passiv antiserum on
 antigen phagocytosis and degra-
 dation by mouse peritoneal
 macrophages
 J. Reticuloendothelial Soc. 6,
 498-510 (1969)

7. Argyris B.F. Transplantation of adult peritoneal cells into newborn mice
Transplantation 8, 241-248
(1969)
8. Argyris B.F. and Effect of antimacrophage serum
D.H. Plotkin on antibody production and
phagocytosis in mice
J. Immunol. 103, 372-373 (1969)
9. Askonas B.A. and Immunogenicity of antigen-con-
J.M. Rhodes taining ribonucleid acid pre-
parations from macrophages
Nature 205, 470-474 (1965)
10. Aschoff L. Ein Beitrag zur Lehre von den MP
aufgrund der Untersuchungen des
Herrn Dr. Kiyono
Verh. dtsch. Ges. Path. 16,
107-110 (1913)
11. Barth L.F., Studies on heterologous antilym-
R.L. Hunter, phocyte and antithymocyte sera
J. Southworth and III. Differential effects of
A.S. Rabson rabbit anti-mouse sera on splenic
lymphocytes and macrophages
J. Immunol. 102, 932-940 (1969)
12. Bennett B. and Action of isoimmune serum on
P. Licursi peritoneal cells in vitro
Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 116,
404-409 (1969)

13. Bennett B. Isolation in vitro of macrophages from various sources in the mouse
Amer. J. Path. 48, 165-168
(1968)
14. Biozzi G., B. Benaceraff and B.N. Halpern Quantitative study of the granulopoietic activity of the reticuloendothelial system
Brit. J. Exp. Path. 34, 441-457
(1953)
15. Bishop D.C. and A.A. Gottlieb Macrophages, RNAs and the immune response
Z. med. Mikrobiol. und Immunol. 51, 1-26
(1970)
16. Boack J.L. and N.A. Mitchison Stimulation of lymphocytes by direct exposure to antigen in vitro
Transpl. Proc. I/II, 539-542
(1969)
17. Colley D.G. and B.H. Waksman Cytotoxic effect of normal rabbit serum on rat lymphoid cells
Transplantation 9, 395-404
(1970)
18. Despont J.P. and A. Cruchaud In vitro and in vivo effects of antimacrophage serum
Nature (Lond.) 223, 838-839
(1969)

19. Dyminski J.W. and B.F. Argyris
Prolongation of allograft survival with antimacrophage serum
Transplantation 8, 595-601
(1969)
20. Ehrenreich B.A. and Z.A. Cohn
The uptake and digestion of iodinated human serum albumin by macrophages in vitro
J. exp. Med. 126, 941-958
(1967)
21. Fishman M.
Antibody formation in vitro
J. exp. Med. 114, 837-856
(1961)
22. Gershon H. and M. Feldman
Studies on the immune reconstitution of sublethally irradiated mice by peritoneal macrophages
Immunology 15, 827-835 (1968)
23. Gottlieb A.A.
Studies on macrophage - RNA involved in antibody production
Proc. nat. Acad. 57, 1849-1856
(1967)
24. Granger G.A. and R.S. Weiser
Homograft targed cells: Contact destruction in vitro by immune macrophages
Science 151, 97-99 (1966)

25. Gronemeyer U.,
H.G. Sonntag und
W. Müller-Ruchholtz Serologische Spezifität und
immunsuppressive Wirksamkeit
nichtabsorbierter und absor-
bierter Pferde - anti-Ratten-
seren
Z. Immunitätsfor., Allergie und
klin. Immunol. 140, 203-209
(1970)
26. Halpern B.N. The role and function of the
reticuloendothelial system in
immunological processes
J. Pharm. and Pharmacol. 11,
321-338 (1968)
27. Hanifin J.M. and
M.J. Cline Human monocytes and macrophages.
Interaction with antigen and
lymphocytes
J. Cell Biol. 46, 97-105 (1970)
28. Hirsch M.S.,
G.W. Gary and
F.A. Murphy In vitro and in vivo properties
of antimacrophage sera
J. Immunol. 102, 656-661 (1969)
29. Jachertz D. Informationsfluß bei der Anti-
körpersynthese
Münchn. Med. Wschr. 8, 328-330
(1970)
30. James K. Clin. exp. Immunol. 2, 685
(1967)
31. James K. and
N.F. Anderson Nature (Lond.) 213, 1195 (1967)

32. Jehn U.W.,
D.M. Musher and
L. Weinstein
The effect of antimacrophage
serum of macrophage - lympho-
cyte interaction in vitro
Proc. Sec. Exp. Med. 134,
241-243 (1970)
33. Jennings J.F. and
L.A. Hughes
Inhibition of phagocytosis by
antimacrophage antibodies
Nature (Lond.) 221, 79-80
(1969)
34. Karnovsky M.L.
Metabolic basis of phagocytic
activity
Physiol. Rev. 42, 143-168
(1962)
35. Kenna Mc M.J. and
K.M. Stevens
Studies on antibody formation
by peritoneal exudates cells in
vitro
J. exp. Med. 111, 573-600
(1960)
36. Kissmeyer-Nielsen F.
and R.E. Kjerbye
Lymphocytotoxic micro-technique
purification of lymphocytes by
flotation
37. Kölsch E.
Patterns of handling and present-
ing antigen by macrophages
Presented at the conference on
mononuclear phagocytes, Leiden,
The Netherlands, september 2-5
(1969), Proceedings in confer-
ence, Blackwell scientific,
Publications in press

38. Kornfeld L. and V. Greenman Effects of total body irradiation on peritoneal cells of mice
Radiation research 29, 433-444
(1966)
39. Land W., R. Rudolph and W. Brendel In vitro Wirkung eines heterologen Antiserums auf Lymphozyten der Ratte: Eine elektronenmikroskopische Studie
Zschr. f. d. ges. Blutforschung 18, 1-12
(1968)
40. Land W., E. Frick, R. Roscher, W. Brendel und A. Baethmann Wirkung eines heterologen Antilymphozytenserums auf die experimentelle allergische Enzephalomyelitis
Klin. Wschr. 47, 633-640 (1969)
41. Land W. und G. Grabs Herstellung und Wirkung eines xenogenen Antimakrophagenserums bei der Ratte
Europ. J. Immunol. Vortragsreferate, 37-38
(1969)
Freiburg i.Br.
42. Land W., Grabs G. and W. Brendel Immunsuppressive effects of anti-macrophage antibodies in rats
Europ. Surg. Res. 1, 211-212
(1969)
43. Land W., R. Sebald, G. Grabs and W. Brendel Prolongation of rabbit xenograft survival with antimacrophage serum in rats
Europ. Surg. Res.

44. Leder L.D. Der Blutmonozyt
Springerverlag Berlin 1967
45. Levey R.H. and Proc. nat. Acad. Sci. 56,
P.B. Medawar 1130 (1966)
46. Loewi G., A. Temple, A study of the effects of anti-
A.P.P. Nind and macrophage sera
M. Axelrad Immunology 16, 99-106 (1969)
47. Lohmann-Matthes M.L. T-cell cytotoxicity and amplifi-
und H. Fischer cation of the cytotoxic reaction
by macrophages
Transplant. Review 17, 150-171
(1973)
48. Marshman A.W.J., Antigenic differences between
M. van der Hart and macrophages and lymphocytes
J.J. van Loghem Clin. exp. Immunol. 6, 899-903
(1970)
49. Metchnikoff E.L. Etudes sur la resorption des
cellules
Ann. Inst. Past. 13, 737-769
(1899)
50. Mitchison N.A. The immunogenicity of antigen
taken up by peritoneal exudate
cells
Immunology 16, 1-14 (1969)

51. Monaco A.P., In: Antilymphocytic serum,
M.L. Wood, p. 111, Ciba-Foundation study
B.A. van der Werf and group Nr. 29 Churchill (1967)
P.S. Russell London
52. Morita T. and A simple method to assess the
E.H. Perkins in vitro engulfing and degrada-
tive potentials of mouse peri-
toneal phagocytic cells
J. Reticuloendothelial. Soc. 2,
406-419 (1965)
53. Müller-Hermelink and Electron observations in rat
W. Müller-Ruchholz lymphnodes following injection
of AMS and ATS
II. Int. Conf. on Lymphatic
Tissues and Germinal Centers in
immune reactions. (1970) Uppsala
54. Noltenius H. und Antikörperbildung und Phagozy-
M. Chahin tose: Funktion einer Zelle
Z. Immunitätsforschung, Aller-
gie und klin. Immun. 139,
312-322 (1970)
55. Nossal G.J.V. Die Regulation der Immunantwort
Klin. Wschr. 47, 568-573 (1969)
56. Ouchterlony O.E. Diffusion in gel methods for
immunological analysis II
Progr. Allergy 6, 30 (1962)

57. Panijel J. and P. Cayeux Immunosuppressive effects of
macrophage antiserum
Immunology 14, 769-780 (1968)
58. Pearsall N.N. and R.S. Weiser The Macrophage
Lea & Febiger Philadelphia
(1970)
59. Phillips-Qualia J.M. Studies on the mechanism of
binding of immune complexes to
phagocytes
Nature 222, 1290-1291 (1969)
60. Pichelmayer R. Klin. Wschr. 44, 594 (1966)
61. Pichlmayer R. Z. ges. exp. Med. 143, 161
(1967)
62. Pichlmayer R., W. Brendel,
Ph. Mikaeloff, B. Wibecke,
J.P. Rassat, J. Bomel,
A. Fateh-Moghadam,
S. Thierfelder,
K. Messmer,
J. Descotes and M. Knedel In: Advance in transplantation
p. 147 (1968) Ed. J. Dausset,
J. Hamburger and G. Mathe,
Munksgaard, Copenhagen
63. Poulter L.W., N.J. Bradley and
J.L. Turk The role of macrophage in skin
allograft rejection
Transplant. 12, 40-44 (1971)

64. Rhodes J.M. and I. Lind Antigen uptake in vivo by peritoneal macrophages from normal mice and those undergoing primary or secondary response
Immunology 14, 511-525 (1968)
65. Rowley D.A. and F.W. Fitch Clonal selection and inhibition of the primary antibody response by antibody
p. 127-140, in: Regulation of the antibody response, ed. by B. Cinader, Springfield III/USA
Ch.C. Thomas (1968)
66. Seeger R.C. and J.J. Oppenheim Synergistic interaction of macrophages and lymphocytes in antigen induced transformation of lymphocytes
J. exp. Med. 132, 44-65 (1970)
67. Sonntag H.G. und W. Müller-Ruchholz Über den Einfluß heterologer Antimakrophagenseren auf die Überlebensdauer allogeneischer Rattenhauttransplantate
Vrlg. 2. Arbeitstagung Dtsch. Ges. Hyg. Mikrobiol. Mainz
(1968) Autoref. Bakt. I. Ref. 215, 515 (1969)
68. Starzl T.E. and H. Hrubovna The transfer of antibody formation by means of nucleoprotein fractions to non immunized recipients
Folia Biol. (Praha) 2, 21-27 (1956)

69. Starzl T.E., Surg. Gyn. Obstet. 124, 301
T.L. Marchioro, (1967)
K.A. Potter,
Y. Iwasaki and
G.J. Cerilli
70. Thiede A., Unterschiedliche morphologische
H.G. Sonntag und Veränderungen an Lymphknoten
W. Müller-Ruchholz nach lokaler Applikation hetero-
loger Antithymozyten- und Anti-
makrophagenseren.
Virchows Archiv Abt. B Zellpath.
3, 302-306 (1969)
71. Thierfelder S., Die Zellspezifität heterologer,
E.D. Möller, sogenannter antilymphozytärer
I. Kimura, P. Dörmer Antiseren von Kaninchen
und M. Eulitz Z. ges. exp. Med. 147, 44-59
(1968)
72. Uhr J.W. Inhibition of antibody formation
by serum antibody
In: Regulation of the antibody
response, p. 114-126, ed. by
B. Cinader, Springfield I/USA
Ch. C. Thomas (1968)
73. Uhr J.W. and Regulatory effect on the immune
G. Müller response
Advanc. Immun. 8, 81-127 (1968)

74. Unanue E.R. Properties and some uses of
antimacrophage antibodies
Nature (Lond.) 218, 36-38
(1968)
75. Unanue E.R. The immune response of mice to
keyholelimpet h mocyanin bound
to macrophages
J. Immunol. 102, 893-898 (1969)
76. Walford R.L., Human lymphocyte typing with
R. Gallagher and isologous antisera. Technical
G.M. Troup considerations and a prelimi-
nary study of the cytotoxic
reaction system
Transplantation 3, 387-401
(1965)
77. Zembala M. and The rapid purification of peri-
G.L. Asherson toneal exudate macrophages by
Ficoll (polysurose) density
gradient centrifugation
Immunology 19, 677-681 (1970)

Herrn Prof. Dr. med. Dr.h.c. W. Brendel danke ich für die Möglichkeit, in seinem kooperativen Institut zu arbeiten.

Herr PD Dr. med. W. Land war so zuvorkommend, mich an die Nahtstellen dieser Arbeit und an weitere Probleme der Transplantatsimmunologie heranzuführen.

Nicht nur assistierend standen mir bei dieser Arbeit FrI. Schülgen und FrI. Brons zur Seite.

Lebenslauf
=====

- 1945 am 30.1. geboren als Sohn des Pfarrers Rudolf
 Sebald und seiner Ehefrau Christine, geb. Seitz
 in Memmingen
- 1952 Umzug nach München
- 1964 Beendigung der Schulzeit mit Abitur am Theresien-
 gymnasium München
- 1965 Stipendiat des Studienwerkes Villigst; halbjähri-
 ges Industriepraktikum im Ruhrgebiet
- 1965/66 Studium an der philosophischen Fakultät der
 FU Berlin
- 1967 -
- 1972 Studium der Medizin an der LMU München
 1971 Gastsemester in Rom
- 1973 Staatsexamen
 Interner Teil der Medizinalassistentenzeit am
 Klinikum Steglitz der FU Berlin
- 1974 Chirurgischer Teil der Medizinalassistentenzeit
 am Städt. Krankenhaus Schwabmünchen
- 1975 Assistenzarzt an der Abteilung für Radiologie
 der Kliniken der Universität Ulm

